

Desarrollo, evaluación y aplicación de marcadores moleculares para el análisis genético de la coquina *Donax trunculus*

Tesis doctoral
Ana Nantón Varela
2016



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

ÁREA DE GENÉTICA

**DESARROLLO, EVALUACIÓN Y APLICACIÓN DE
MARCADORES MOLECULARES PARA EL ANÁLISIS
GENÉTICO DE LA COQUINA *Donax trunculus***

Memoria que para optar al Título de Doctor Internacional presenta

Ana Nantón Varela

2015

Directores: Dra. Josefina Méndez Felpeto, Dra. Ruth Freire Álvarez y Dr. Alberto Arias Pérez



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Dña. Josefina Méndez Felpeto, Doctora en Biología y Catedrática de Universidad del Área de Genética del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidade da Coruña, Dña. M^a Ruth Freire Álvarez, Doctora en Biología por la Universidade da Coruña y D. Alberto Arias Pérez, Doctor en Biología y contratado en la Universidade da Coruña,

INFORMAN:

Que el trabajo titulado “Desarrollo, evaluación y aplicación de marcadores moleculares para el análisis genético de la coquina *Donax trunculus*” presentado por Dña. Ana Nantón Varela para optar al Título de Doctor Internacional en Biología, ha sido realizado bajo nuestra dirección y, considerándolo finalizado, autorizamos su presentación y defensa.

A Coruña, 11 de Septiembre de 2015

Fdo. Josefina Méndez Felpeto

Fdo. M^a Ruth Freire Álvarez

Fdo. Alberto Arias Pérez

FINANCIACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Esta tesis se desarrolló en el marco los proyectos de investigación “Cultivo en criadero, preengorde en batea e análise da diversidade xenética da coquina *Donax trunculus*”, dirigido por la Dra. Josefina Méndez Felpeto y financiado por la Consellería de Medio Rural e do Mar – Xunta de Galicia (referencia 10MMA103013) y “Estudo dos bancos naturais de coquina: problemática da súa desaparición en Galicia”, dirigido por la Dra. Dorotea Martínez Patiño y financiado por la Consellería de Medio Rural e do Mar – Xunta de Galicia (referencia PGICIT-CIMA 13/08).

La autora de la tesis ha disfrutado de las siguientes ayudas:

Beca predoctoral del programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación (Gobierno de España, 2012-2015).

Ayuda complementaria dirigida a beneficiarios de ayudas FPU para estancias breves o traslados temporales del Programa Estatal de Promoción del Talento y su Empleabilidad (Gobierno de España, 2015).

ESTANCIAS

2015 Estancia de 3 meses en el Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA) – Olhão (Portugal). Supervisor: Miguel José Baptista Gaspar

PUBLICACIONES

Parte del trabajo realizado en esta tesis se refleja en las siguientes publicaciones:

Nantón A, Arias-Pérez, Méndez J, Freire R (2014) Characterization of nineteen microsatellite markers and development of multiplex PCRs for the wedge clam *Donax trunculus* (Mollusca: Bivalvia). *Molecular Biology Reports* **41**, 5351-5357

Nantón A, Freire R, Arias-Pérez A, Gaspar MB, Méndez J (2015) Identification of four *Donax* species by PCR-RFLP analysis of cytochrome c oxidase subunit I (COI). *European Food Research and Technology* **240**, 1129-1133

Á memoria do meu pai
Á miña nai e aos meus irmáns
A Julio

AGRADECEMENTOS

Son moitas as persoas que dun xeito ou doutro fixeron posible o comezo e a finalización deste traballo. A todas elas, moitas gracias.

En primeiro lugar, gustaríame agradecer aos directores desta tese, as Dras. Josefina Méndez e Ruth Freire e ao Dr. Alberto Arias, por permitirme levar a cabo este proxecto, por apoiarme e axudarme para que saíse a diante. E sobre todo, pola súa dedicación e paciencia, por estar sempre dispoñibles para atender as miñas dúbidas, a pesar, en moitas ocasións, da distancia e o cambio horario.

A todos os participantes dos proxectos de investigación nos que se inclúe este traballo, por compartir conmigo os seus coñecementos sobre a evolución da coquina na nosa comunidade e pola súa colaboración para a obtención das mostras. En especial a Tea, a Susana e a Andrea, ás que coñecín ao inicio desta andadura e fixeron posible a obtención dunha parte importante das coquinas empregadas neste estudio.

Tamén quero agradecer ao Dr. Miguel Gaspar do Instituto Português do Mar e da Atmosfera por acollerme durante a miña estadía e pola súa colaboración. Moi en especial, a tripulación do *Diplodus*, por ensinarme como é o traballo a bordo dun buque de investigación, por estar sempre pendentes de min e coidarme cando o precisei. E tamén polos bos ratos disfrutados, os paseos e as conversas. A pesar dos “enxugues” e os días de mar de fondo, foi unha experiencia fabulosa.

Aos meus compañeiros do laboratorio, aos que se foron e aos que permanecen, por estar sempre dispostos a ensinarme, axudarme e responder ás miñas dúbidas. Esta tese non sería posible sen os vossos consellos e a vosa colaboración. Gracias a todos polos bos momentos compartidos, tanto dentro como fora do laboratorio, polos cafés, as ceas e, como non, por esa “canción”. Estou segura que atopar xente como vós non vai ser doado. E sobre todo, gracias aos que estiveron ao meu carón nesta última etapa, por aguantarme e animarme, sei que non foi sinxelo. Á miña compañeira de docencia, por facer que as tardes de prácticas, a preparación de *buffers* e a doblaxe de moscas fosen tarefas divertidas.

Ás miñas amigas, polos bos momentos compartidos e os que nos quedan por compartir, por axudarme a desconectar na fin de semana e polas mensaxes de ánimo esta última tempada. A Bea Rocha, gracias por estar sempre aí.

Á miña familia, por estar ao meu carón sempre que os precisei. A Pepe e a Emilia, por todos os anos compartidos, por quererme e arrouparme cando máis o precisei. E en especial, aos meus irmáns, e tamén a Carlos e a Vane, por alegrarse e festexar connigo cada pequeno logro pero, sobre todo, por preocuparse por min e tenderme unha man cando as cousas non saíron todo o ben que se esperaba. Gracias por confiar en min e por ser a mellor familia que poidese desexar. Aos pequenos da casa, Álex e Khoa, porque os seus mimos e os seus sorrisos déronme enerxía nesta última etapa da tese. A Aroa, porque cada vez que escoito a palabra “madríña” sinto que recibín un dos mellores regalos da vida.

A Julio, por axudarme a que todo fose máis doado, por tentar contaxiarme o seu optimismo, aínda que moitas veces non fose sinxelo, e sobre todo, por acompañarme e apoiarme nesta etapa.

Sen dúbida, se hai alguén que merece un GRACIAS eses son os meus pais, por educarme na humildade e ensinarme que con esforzo e constancia é posible chegar á meta. Ao meu pai, que me deu a maior lección da vida: aprender a loitar contra as adversidades e, sobre todo, a non renderse nunca. O recordo do seu sorriso e das súas apertas perdurarán en min mentres viva. Á miña nai, por estar sempre ao meu carón para escoitarme, apoiarme e animarme. Gracias por crer en min e no meu traballo. Fai un tempo fíxenme a promesa que loitaría cada día por arrincarlle un sorriso, espero que a alegría de verme rematar esta etapa perdure por un par deles.

GRACIAS

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa.” Mahatma Gandhi

RESUMEN

La coquina *Donax trunculus* es un importante recurso marisquero en la Península Ibérica que se encuentra en regresión en los bancos naturales gallegos. Desafortunadamente, no existen trabajos sobre variación genética en y entre poblaciones, necesarios para desarrollar estrategias de conservación, gestión y recuperación. En este trabajo se estudió la diversidad y estructura poblacional de bancos naturales de la Península Ibérica mediante PCRs *multiplex* de microsatélites y marcadores de ADN mitocondrial (citocromo B y COI). También se usaron microsatélites y análisis de paternidad para evaluar la obtención de semilla en criadero y el posible impacto de su empleo en repoblación. Por último, se evaluaron PCR-RFLPs del gen mitocondrial COI para identificar cuatro especies del género *Donax*. La evaluación poblacional reveló la existencia de diferenciación genética entre Atlántico y Mediterráneo. El análisis de paternidad mostró un descenso moderado del tamaño efectivo esperado de los reproductores y un incremento ligero de la endogamia (< 5%), lo que evitaría la pérdida de alelos a baja frecuencia. Además, se observó diferenciación genética entre reproductores y dos grupos de semilla (T2 y T4), por lo que su empleo en repoblación podría alterar la estructura genética de los bancos naturales. Tres endonucleasas mostraron patrones de restricción para el gen COI que permitieron discriminar entre *D. semistriatus*, *D. trunculus*, *D. variegatus* y *D. vittatus*.

RESUMO

A cadelucha *Donax trunculus* é un importante recurso marisqueiro na Península Ibérica que se atopa en regresión nos bancos naturais galegos. Desafortunadamente, os traballos sobre variación xenética en e entre poboacións, precisos para levar a cabo estratexias de conservación, xestión e recuperación, son inexistentes. Neste traballo estudouse a diversidade e estrutura poboacional de bancos naturais da Península Ibérica mediante PCRs *multiplex* de microsatélites e marcadores de ADN mitocondrial (citocromo B e COI). Tamén se empregaron microsatélites para, mediante análise de paternidade, avaliar a obtención de semente en criadeiro así como o posible impacto do seu emprego en repoboación. Por último, avaliáronse PCR-RFLPs do xene mitocondrial COI para a identificación de catro especies do xénero *Donax*. A avaliación poboacional revelou a existencia de diferenciación xenética entre Atlántico e Mediterráneo. A análise de paternidade mostrou un descenso moderado do tamaño efectivo esperado dos reproductores e un incremento lixeiro da endogamia (<5%), o que evitaría a perda de alelos a baixa frecuencia. Ademais, observouse

diferenciación xenética entre reprodutores e dous grupos de semente (T2 e T4), polo que o seu emprego na repoboación podería alterar a estrutura xenética dos bancos naturais. Tres endonucleasas mostraron patróns de restricción para o xene COI que permitiron discriminar entre *D. semistriatus*, *D. trunculus*, *D. variegatus* e *D. vittatus*.

ABSTRACT

The wedge clam *Donax trunculus* is an important shellfish resource in the Iberian Peninsula that it is in regression in Galician natural beds. Unfortunately, studies about genetic variation in and between populations, which are necessary to develop conservation, management and restoration strategies, are nonexistent. In this study microsatellite multiplex PCRs and mitochondrial markers (Cytochrome B and COI) were used to analyze the population diversity and differentiation of natural beds from Iberian Peninsula. Paternity assignment was also carried out in hatchery seed with microsatellites. This was used to evaluate genetic changes introduced through hatchery production and to assess the potential impact of using this seed in restocking. Finally, PCR-RFLPs of mitochondrial COI gene were evaluated to distinguish four *Donax* species. Population analysis displayed the existence of genetic differentiation between Atlantic and Mediterranean. Parentage analysis showed a moderate reduction of the breeders' expected effective population size and a slight increase of inbreeding (<5%), which would allow to preserve low frequency alleles. Moreover, genetic differentiation was observed between breeders and two groups of seed (T2 and T4). Its use in restoration could change the genetic structure of natural populations. Three endonucleases showed restriction patterns of COI gene that allowed to distinguish between *D. semistriatus*, *D. trunculus*, *D. variegatus* and *D. vittatus*.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas y símbolos.....	I
Índice de figuras	V
Índice de tablas.....	IX

Capítulo 1: Introducción general y objetivos 1

1.1. Introducción general	3
1.1.1. Biología de la especie.....	3
1.1.2. Producción e interés económico	4
1.1.3. Marcadores moleculares	6
1.1.3.1. Características generales y tipos de marcadores	6
1.1.3.2. RFLPs	7
1.1.3.3. ADN mitocondrial	8
1.1.3.4. Microsatélites	11
1.1.4. Aplicaciones de los marcadores moleculares	14
1.1.4.1. Análisis de la variación genética en poblaciones naturales	14
1.1.4.2. Evaluación de los aspectos genéticos del cultivo en criadero..	15
1.1.4.3. Identificación de especies	16
1.1.5. Estudios genéticos en <i>D. trunculus</i>	17
1.2. Objetivos.....	19

Capítulo 2: Desarrollo de marcadores microsatélite y PCRs *multiplex* 21

2.1. Introducción	23
2.2. Material y métodos.....	28
2.2.1. Material de estudio y extracción de ADN	28
2.2.2. Detección de secuencias microsatélite mediante <i>dot-blot</i>	29
2.2.3. Construcción de genotecas enriquecidas en secuencias microsatélite ..	30
2.2.4. Secuenciación de clones e identificación de secuencias microsatélite...	32
2.2.5. Amplificación de <i>loci</i> microsatélite mediante PCR <i>monolocus</i>	33
2.2.6. Análisis de la diversidad genética	34
2.2.7. Diseño y optimización de PCRs <i>multiplex</i>	34
2.3. Resultados	36
2.4. Discusión	43

Capítulo 3: Diversidad genética y estructura poblacional de *Donax trunculus* en la Península Ibérica mediante marcadores microsatélite 49

3.1. Introducción	51
3.2. Material y métodos.....	54
3.2.1. Material de estudio y extracción de ADN	54
3.2.2. Análisis de marcadores microsatélite.....	55
3.2.2.1. Diversidad genética	55
3.2.2.2. Diferenciación poblacional.....	56
3.3. Resultados.....	58
3.3.1. Diversidad genética	58
3.3.2. Estructura poblacional	60
3.4. Discusión	71

Capítulo 4: Diversidad genética y estructura poblacional de *Donax trunculus* en la Península Ibérica mediante marcadores de ADN mitocondrial 77

4.1. Introducción	79
4.2. Material y métodos.....	81
4.2.1. Material de estudio y extracción de ADN	81
4.2.2. Amplificación del gen mitocondrial citocromo b (CitB).....	81
4.2.3. Amplificación del gen citocromo c oxidasa subunidad I (COI)	82
4.2.4. Análisis comparativo CitB tipo F y M: diversidad nucleotídica y test de selección	82
4.2.5. Análisis de diversidad genética y diferenciación poblacional	83
4.2.6. Análisis de inferencia demográfica y test de selección	84
4.3. Resultados.....	85
4.3.1. Identificación de los tipos mitocondriales F y M	85
4.3.2. Alineamiento de secuencias e identificación de haplotipos	87
4.3.2.1. CitB F y M	87
4.3.2.2. COI.....	89
4.3.3. Estimaciones de diversidad genética	90
4.3.4. Estructura poblacional	92
4.3.5. Análisis demográfico.....	99
4.4. Discusión	104

Capítulo 5: Análisis de paternidad en *Donax trunculus* empleando marcadores microsatélite..... 113

5.1. Introducción	115
5.2. Material y métodos.....	118
5.2.1. Material de estudio y extracción de ADN	118
5.2.2. Rediseño y optimización de PCRs <i>multiplex</i>	119
5.2.3. Análisis de relaciones genéticas entre individuos	119
5.2.3.1. Asignación de paternidad	119
5.2.3.2. Análisis de la contribución de los progenitores a la semilla ...	121
5.2.3.3. Estimaciones de parentesco	122
5.2.3.4. Tamaño efectivo y tasa de endogamia	122
5.2.4. Análisis de marcadores microsatélite: diversidad y diferenciación genética entre semilla, reproductores y población natural	123
5.3. Resultados.....	125
5.3.1. Rediseño y optimización de las PCRs <i>multiplex</i>	125
5.3.2. Asignación de paternidad y contribución de los reproductores	125
5.3.3. Análisis de parentesco.....	131
5.3.4. Tamaño efectivo de reproductores y tasa de endogamia.....	132
5.3.5. Análisis de marcadores microsatélite.....	133
5.3.5.1. Diversidad genética en población natural, reproductores y semilla	133
5.3.5.2. Diferenciación genética en población natural, reproductores y semilla	134
5.4. Discusión	136

Chapter 6: Identification of four *Donax* species by PCR-RFLP analysis of cytochrome c oxidase subunit I (COI)..... 147

6.1. Introduction	149
6.2. Material and methods	151
6.3. Results and discussion	153

Conclusions..... 159

Bibliografía..... 163

Anexos.....	201
Anexo A. Características de los <i>loci</i> microsatélite incluidos en la <i>Multiplex</i> 1 y analizados en 17 localidades de la Península Ibérica.....	203
Anexo B. Características de los <i>loci</i> microsatélite incluidos en la <i>Multiplex</i> 2 y analizados en 17 localidades de la Península Ibérica.....	208
Anexo C. Características de los <i>loci</i> microsatélite incluidos en la <i>Multiplex</i> 3 y analizados en 17 localidades de la Península Ibérica.....	213
Anexo D. Frecuencia absoluta de los 87 haplotipos del gen CitB tipo F en las catorce localidades estudiadas y porcentaje de individuos que portan cada haplotipo.....	218
Anexo E. Frecuencia absoluta de los 51 haplotipos del gen CitB tipo M en las catorce localidades estudiadas y porcentaje de individuos que portan cada haplotipo.....	220
Anexo F. Frecuencia absoluta de los 109 haplotipos del gen COI en las catorce localidades estudiadas y porcentaje de individuos que portan cada haplotipo.....	222
Anexo G. Características de los <i>loci</i> microsatélite analizados en la población natural, lote de reproductores y semilla.....	225
 Publicaciones.....	 229
Characterization of nineteen microsatellite markers and development of multiplex PCRs for the wedge clam <i>Donax trunculus</i> (Mollusca: Bivalvia)	231
Identification of four <i>Donax</i> species by PCR-RFLP analysis of cytochrome c oxidase subunit I (COI)	239

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNmt	ADN mitocondrial
ADNr	ADN ribosomal
AFLPs	polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (<i>Amplified Fragment Length Polymorphisms</i>)
AMOVA	análisis molecular de la varianza
ARN	ácido ribonucleico
BSA	seroalbúmina bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CitB	citocromo B
COI	citocromo C oxidasa subunidad I
dNTPs	dexosinucleótidos trifosfato
DUI	herencia doblemente uniparental (<i>Double Uniparental Inheritance</i>)
EDTA	ácido etilendiaminetetraacético
ESTs	marcadores de secuencia expresada (<i>Expressed Sequence Tags</i>)
F	sustituciones fijadas
F_{is}	coeficiente de endogamia
F_{st}	índice de fijación
h	número de haplotipos
H_d	diversidad haplotípica
H_e	heterocigosidad esperada
H_o	heterocigosidad observada
HW	Hardy-Weinberg
IAM	modelo de infinitos alelos (<i>Infinite Alleles Model</i>)
IPTG	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
ISSRs	inter secuencias simples repetidas (<i>Inter Simple Sequence Repeats</i>)
K_A	distancias no sinónimas
KAM	modelo de k alelos (<i>K-allele Model</i>)

K_s	distancias sinónimas
LGM	Último Máximo Glacial (<i>Last Glacial Maximum</i>)
LSS	N-lauril sarcosine sal sódica
Md	número medio de descendientes
Na	número de alelos
Ne	tamaño efectivo
NGS	secuenciación de nueva generación (<i>Next Generation Sequencing</i>)
Nm	número de migrantes
nMDS	escalamiento multidimensional no métrico
P	sustituciones polimórficas
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PIC	contenido en información del polimorfismo
r	coeficiente de parentesco
RAPDs	ADN polimórfico amplificado al azar (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)
Rd	rango del número de descendientes
RFLPs	polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>)
Rs	riqueza alélica
SDS	dodecilsulfato sódico
SMM	modelo de mutación paso a paso (<i>Stepwise Mutational Model</i>)
SNPs	polimorfismos de un solo nucleótido (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SSC	citrato sódico salino
SSRs	secuencias simples repetidas (<i>Simple Sequence Repeats</i>)
STRs	repeticiones cortas en tándem (<i>Short Tandem Repeats</i>)
TAE	tris-acetato EDTA
TBE	tris-borato EDTA
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
UV	ultravioleta

X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
ΔF	incremento de endogamia
π	diversidad nucleotídica

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Coquina <i>Donax trunculus</i>	3
Figura 1.2. Nivel de capturas (kg x 100 000) y valor medio por kg (€/kg) de moluscos bivalvos descargados en las lonjas gallegas durante el año 2014. Los datos proceden del Servicio de Estadística de la Consellería do Mar, Xunta de Galicia (www.pescadegalicia.com)	5
Figura 1.3. Capturas de <i>D. trunculus</i> según los datos de primera venta registrados por la Plataforma Tecnológica de Pesca de la Xunta de Galicia	6
Figura 1.4. Esquema de la herencia doblemente uniparental (DUI) en la coquina <i>D. trunculus</i> y distribución de los genomas mitocondriales por tipo de tejido y sexo	10
Figura 1.5. A. Deslizamiento durante la replicación del ADN. La cadena molde contiene 6 repeticiones del motivo microsatélite representado por rectángulos (azul en la cadena molde y verde en la de nueva síntesis). B. Entrecruzamiento desigual entre cromosomas homólogos. Las regiones naranjas y azules corresponden a las secuencias de los motivos microsatélite. (Modificado de Oliveira y col., 2006)	12
Figura 2.1. Hibridación <i>dot-blot</i> con las sondas (AC) ₁₀ , (ACC) ₇ y (GATA) ₆ en diluciones de ADN a 100 ng/μl (A), 50 ng/μl (B), 25 ng/μl (C), 12,5 ng/μl (D) y 6,25 ng/μl (E).....	36
Figura 2.2. Distribución de los 15 <i>loci</i> microsatélite en tres PCRs <i>multiplex</i> . La longitud de las bandas es proporcional al rango de tamaño de los alelos	40
Figura 3.1. Situación geográfica de las localidades de muestreo: Altar (AL); O Vicedo (VC); Lombo das Navallas (LN); O Barqueiro (BQ); Cariño (CR); Vilarrube (VI); Bastiagueiro (BS); Corme – Laxe (CL); A Lanzada (LZ); Setúbal (SE); Monte Gordo (MG); Matalascañas (MÑ); Carboneras (CA); Fuengirola (FU); Gandía (GA); Delta del Ebro (DE); Maresme (MA)	54
Figura 3.2. Representación del nMDS realizado sobre la matriz de valores <i>Fst</i> entre pares de localidades	63
Figura 3.3. Árbol <i>Neighbour-joining</i> para las 17 localidades de <i>D. trunculus</i> basado en la distancia Cavalli-Sforza y Edwards (1967) calculada a partir de las frecuencias alélicas de 12 <i>loci</i> microsatélite. Los números de los nodos indican los valores <i>bootstrap</i> (10 000 réplicas). Los valores <i>bootstrap</i> inferiores al 50% no se muestran .	64
Figura 3.4. Distribución de la verosimilitud estimada de K (A) y ΔK (B). En el gráfico de verosimilitud (A) se representa la media del Ln de la probabilidad estimada de los datos para cada valor de K [LnPr(X K)] empleando 20 réplicas. En el gráfico de ΔK (B) no están representados los valores de K=1 y K=17 al calcularse ΔK como la diferencia entre valores consecutivos de K	66
Figura 3.5. Análisis bayesiano de agrupación basado en marcadores microsatélite considerando K=2 (A), K=3 (B) y K=4 (C). Cada color representa un grupo. Cada individuo se representa como una barra vertical dividida en segmentos con colores que corresponden al coeficiente estimado de pertenencia a cada uno de los K grupos.....	68

Figura 3.6. Relación entre la distancia genética entre pares de localidades y la distancia geográfica al considerar todas las localidades (A) y al considerar únicamente las situadas en la costa del océano Atlántico (B)	70
Figura 4.1. Distribución de los haplotipos del gen CitB tipo F en las localidades de estudio. Los haplotipos se representan con colores y la altura de las barras es proporcional a las frecuencias haplotípicas. Los haplotipos únicos no están representados.....	87
Figura 4.2. Distribución de los haplotipos del gen CitB tipo M en las localidades de estudio. Los haplotipos se representan con colores y la altura de las barras es proporcional a las frecuencias haplotípicas. Los haplotipos únicos no están representados.....	88
Figura 4.3. Distribución de los haplotipos del gen COI en las localidades de estudio. Los haplotipos se representan con colores y la altura de las barras es proporcional a las frecuencias haplotípicas. Los haplotipos únicos no están representados	90
Figura 4.4. Intervalos de confianza de las medias de diversidad haplotípica y nucleotídica para los genes CitB tipo F, CitB tipo M y COI.....	92
Figura 4.5. Representación del nMDS realizado sobre la matriz de valores <i>Fst</i> entre pares de localidades para cada uno de los genes analizados.....	96
Figura 4.6. Relación entre la distancia genética entre pares de localidades y la distancia geográfica al considerar todas las localidades (A) y al considerar únicamente las del Atlántico (B) para los genes CitB tipo F, CitB tipo M y COI	98
Figura 4.7. Red de haplotipos obtenida para el gen CitB tipo F. Las localidades se representan con colores y los sectores de los gráficos son proporcionales a la frecuencia del haplotipo en cada localidad. Los haplotipos únicos no están representados.....	99
Figura 4.8. Red de haplotipos obtenida para el gen CitB tipo M. Las localidades se representan con colores y los sectores de los gráficos son proporcionales a la frecuencia del haplotipo en cada localidad. Los haplotipos únicos no están representados.....	100
Figura 4.9. Red de haplotipos obtenida para el gen COI. Las localidades se representan con colores y los sectores de los gráficos son proporcionales a la frecuencia del haplotipo en cada localidad. Los haplotipos únicos no están representados.....	101
Figura 4.10. Distribución de <i>mismatches</i> para los genes CitB tipo F, CitB tipo M y COI en las regiones del Atlántico y del Mediterráneo	102
Figura 5.1. Probabilidad de exclusión tipo 1 y 2 cuando se combinaron de uno a diez <i>loci</i> . Los marcadores se añadieron en orden decreciente de valor PIC.....	126
Figura 5.2. Contribución a la semilla de las madres con más de un descendiente ..	128
Figura 5.3. Contribución a la semilla de los padres con más de un descendiente ...	129
Figura 5.4. Contribución a la descendencia de las parejas con más de un hijo	130

Figura 5.5. Valores de parentesco entre parejas de reproductores (Repr.), semilla total y grupos de semilla (T1, T2, T3 y T4), excluyendo a los individuos con menos de 6 *loci* genotipados y las comparaciones con valores inferiores a -2. Los extremos inferior y superior de las cajas representan el primer y el tercer cuartil, y la línea horizontal interna la mediana. Las cruces muestran la media. Las líneas verticales representan el intervalo entre el tercer y el primer cuartil y más menos 1,5 veces el rango intercuartílico, respectivamente. Los círculos indican los valores atípicos..... 132

Figure 6.1. COI PCR products of *D. vittatus* (lanes 2-9), *D. variegatus* (lanes 10-13), *D. semistriatus* (lanes 14-17) and *D. trunculus* (lanes 18-20) using universal primers (LCO1490 and HCO2198). A 50-bp ladder was used as the DNA marker (lane 1). Negative control (lane 21)..... 153

Figure 6.2. COI PCR products of *D. semistriatus* (lanes 2-4), *D. trunculus* (lanes 5-7), *D. variegatus* (lanes 8-10) and *D. vittatus* (lanes 11-13) using degenerate primers (COIDonax-F and COIDonax-R). A 50-bp ladder was used as the DNA marker (lane 1). Negative control (lane 14)..... 154

Figure 6.3. Restriction analysis of the COI PCR products of *D. trunculus* (lanes 3, 4), *D. semistriatus* (lanes 5, 6), *D. variegatus* (lanes 7, 8) and *D. vittatus* (lanes 9, 10) with *AluI*. Lanes 1, 2 and 11 are a 50-bp DNA marker, a undigested COI product and a 100-bp DNA marker, respectively 155

Figure 6.4. Restriction analysis of the COI PCR products of *D. semistriatus* (lanes 3, 4), *D. trunculus* (lanes 5, 6), *D. variegatus* (lanes 7, 8) and *D. vittatus* (lanes 9, 10) with *HaeIII*. Lanes 1, 2 and 11 are a 50-bp DNA marker, a undigested COI product and a 100-bp DNA marker, respectively 155

Figure 6.5. Restriction analysis of the COI PCR products of *D. semistriatus* (lanes 3, 4), *D. trunculus* (lanes 5, 6), *D. variegatus* (lanes 7, 8) and *D. vittatus* (lanes 9, 10) with *MspI*. Lanes 1, 2 and 11 are a 50-bp DNA marker, a undigested COI product and a 100-bp DNA marker, respectively 156

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Características de los clones obtenidos en las genotecas construidas.....	37
Tabla 2.2. Características de los 19 marcadores microsatélite identificados	38
Tabla 2.3. Diversidad genética de los <i>loci</i> microsatélite analizados en la localidad de Vilarrube.....	39
Tabla 2.4. Características de las PCRs <i>multiplex</i> optimizadas	41
Tabla 2.5. Características de los <i>loci</i> combinados en las PCRs <i>multiplex</i> (1, 2, 3) en individuos de Vilarrube.....	42
Tabla 3.1. Estimaciones de diversidad genética, rango de tamaño de los alelos y coeficiente de endogamia para cada <i>locus</i>	58
Tabla 3.2. Diversidad genética en 17 localidades de <i>D. trunculus</i> en la Península Ibérica.....	59
Tabla 3.3. Frecuencias estimadas de alelos nulos en las combinaciones <i>locus</i> -localidad que no se encontraron en equilibrio HW	60
Tabla 3.4. Valores <i>Fst</i> por <i>locus</i> y global	61
Tabla 3.5. Valores <i>Fst</i> por pares de localidades (sobre la diagonal) y <i>P</i> -valores correspondientes (bajo la diagonal)	62
Tabla 3.6. Estimaciones de <i>Nm</i> entre pares de localidades	65
Tabla 3.7. AMOVA considerando a) tres grupos: Atlántico, Mediterráneo y FU, b) dos grupos: Atlántico incluyendo FU y Mediterráneo y c) dos grupos: Atlántico y Mediterráneo incluyendo FU.....	69
Tabla 4.1. Número de sustituciones sinónimas y no sinónimas fijadas (F) y polimórficas (P) entre los tipos F y M del CitB.....	86
Tabla 4.2. Test <i>D</i> de Tajima para ambos tipos de CitB por localidad y total	86
Tabla 4.3. Estimaciones de diversidad genética para los genes CitB (tipos F y M) y COI... 91	91
Tabla 4.4. Valores <i>Fst</i> por pares de localidades en el CitB tipo F (sobre la diagonal) y CitB tipo M (bajo la diagonal)	94
Tabla 4.5. Valores <i>Fst</i> por pares de localidades en el COI.....	95
Tabla 4.6. Análisis molecular de la varianza describiendo la división de la variación genética en las muestras de <i>D. trunculus</i>	97
Tabla 4.7. Test de neutralidad para las dos regiones geográficas inferidas	103
Tabla 5.1. Características de los grupos de semilla	118
Tabla 5.2. Características de la PCR <i>Multiplex 2'</i>	125

Tabla 5.3. Características de los 10 microsatélites analizados en el lote de reproductores	126
Tabla 5.4. Participación de machos y hembras en la reproducción.....	127
Tabla 5.5. Estimaciones de N_e y ΔF asumiendo tres supuestos.....	133
Tabla 5.6. Diversidad genética de la población natural, los reproductores y la semilla.....	134
Tabla 5.7. Valores F_{st} por pares de muestras.....	135
Table 6.1. Expected fragment sizes from restriction digests of COI PCR product with <i>AluI</i> , <i>HaeIII</i> and <i>MspI</i>	154

Introducción general y objetivos



1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1.1. *Biología de la especie*

La coquina *Donax trunculus* (Linné, 1758) es un molusco bivalvo perteneciente a la clase Bivalvia, dentro del orden Veneroida y de la familia Donacidae. Esta especie presenta una amplia distribución Atlántico-Mediterránea, encontrándose a lo largo del océano Atlántico, desde Senegal a Francia (Tebble, 1966), así como, en el mar Mediterráneo y el mar Negro (Bayed y Guillou, 1985). En el Arco Atlántico se distribuye en la franja intermareal. Esta especie habita en playas de arena expuestas a los ritmos de las mareas, intenso oleaje y sedimentos inestables (Brown y McLachlan, 1990). En el Mediterráneo *D. trunculus* se distribuye preferentemente entre los 0 y los 2 m de profundidad, y entre los 0 y los 6 m en las costas del Atlántico, alcanzando una elevada densidad entre los 0 y los 3 m (Gaspar y col., 1999). La coquina es muy sensible a las variaciones en el tamaño del grano de arena, especialmente durante los estadios tempranos del crecimiento (De la Huz y col., 2002).

D. trunculus se caracteriza por presentar una concha con morfología similar a la de un triángulo escaleno y cuneiforme (Bucquoy y col., 1898) (Figura 1.1). Esta morfología hace que este bivalvo sea un excelente excavador, ya que la forma de cuña que presentan las especies de este género facilita su penetración en el sedimento (McLachlan y col., 1995). Las valvas son de naturaleza calcárea, con bordes dentados y unidas por una charnela con dos dientes cardinales en cada lado y un frágil ligamento que abre las valvas en su región dorsal. El umbo aparece desplazado hacia la parte anterior. La superficie de las valvas de *D. trunculus* es lisa y brillante, con líneas de crecimiento poco notables al tacto. La coloración de la concha es muy variable, apareciendo ejemplares en tonos amarillos, tostados y violáceos (Figura 1.1).



Figura 1.1. Coquina *Donax trunculus*

La coquina es una especie gonocórica que a nivel macroscópico exhibe una diferencia clara en la coloración de la gónada en los períodos de madurez, presentando la gónada femenina un color violáceo y la masculina blanquecino (Tirado y Salas, 1998). La fecundación es externa, liberando los gametos al medio marino por el sifón exhalante. Aunque pueden existir ligeras variaciones según el ambiente, el ciclo gametogénico de *D. trunculus* comienza a finales de noviembre y el desove tiene lugar entre los meses de marzo y agosto (Gaspar y col., 1999). El desarrollo larvario de *D. trunculus* dura unos 20 – 25 días, momento en el que se alcanza el estado de larva pedivelíger y se produce la fijación y el inicio de la vida bentónica (Louzán y col., 2008). La madurez, que depende de la edad y no de la talla (Gaspar y col., 1999), se alcanza durante el primer año de vida. El crecimiento de los individuos de esta especie depende de varios factores como son la temperatura, las condiciones tróficas o la densidad de población (Ansell y Bodoy, 1979; Neuberger-Cywiak y col., 1990; Zeichen y col., 2002). La esperanza de vida es entre 3 y 5 años siendo, generalmente, más largo en la costa Atlántica que en la Mediterránea (Ramón y col., 1995; Bayed, 1998; Zeichen y col., 2002).

1.1.2. Producción e interés económico

La coquina es una especie explotada con fines comerciales en Portugal (Gaspar y col., 1999; Chícharo y col., 2002; Pereira y col., 2012), Italia (Zeichen y col., 2002), Francia (Thébaud y col., 2005) y España (Ramón y col., 1995; Molares y col., 2008). En Galicia, constituye un importante recurso para el sector marisquero debido a su elevado valor económico. Atendiendo a las estadísticas de la Plataforma Tecnológica de Pesca de la Xunta de Galicia (<http://www.pescadegalicia.com>), en el año 2014 fue el bivalvo que alcanzó un mayor precio medio (26,40 €/kg) pero una de las especies de las que menor cantidad (7737,60 kg) se vendió en las lonjas de la comunidad (Figura 1.2).

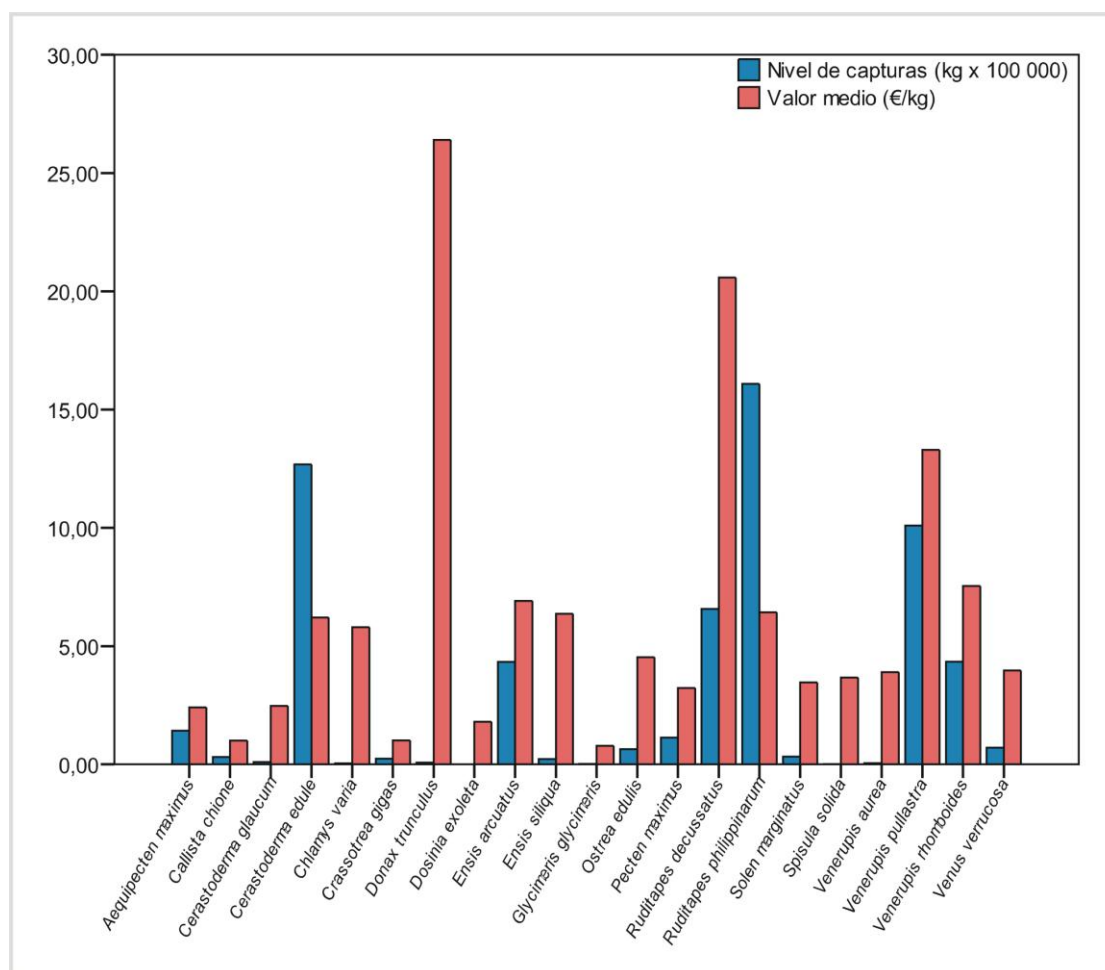


Figura 1.2. Nivel de capturas (kg x 100 000) y valor medio por kg (€/kg) de moluscos bivalvos descargados en las lonjas gallegas durante el año 2014. Los datos proceden del Servicio de Estadística de la Consellería do Mar, Xunta de Galicia (www.pescadegalicia.com)

Las capturas de *D. trunculus* han experimentado un descenso en los últimos años y en el 2014 la cantidad de coquina extraída (7737,60 kg) fue inferior a la mitad de la extraída en el 2001 (16 879,45 kg) (Figura 1.3). Este descenso ha provocado que el número de cofradías gallegas que explotan el recurso sea cada vez menor, de hecho, en los últimos 10 años la extracción ha estado prácticamente monopolizada por la cofradía de Cedeira (Figura 1.3). Este declive podría relacionarse con la explotación a la que se ha visto sometida esta especie, que habría provocado la regresión de los bancos naturales de la costa gallega.

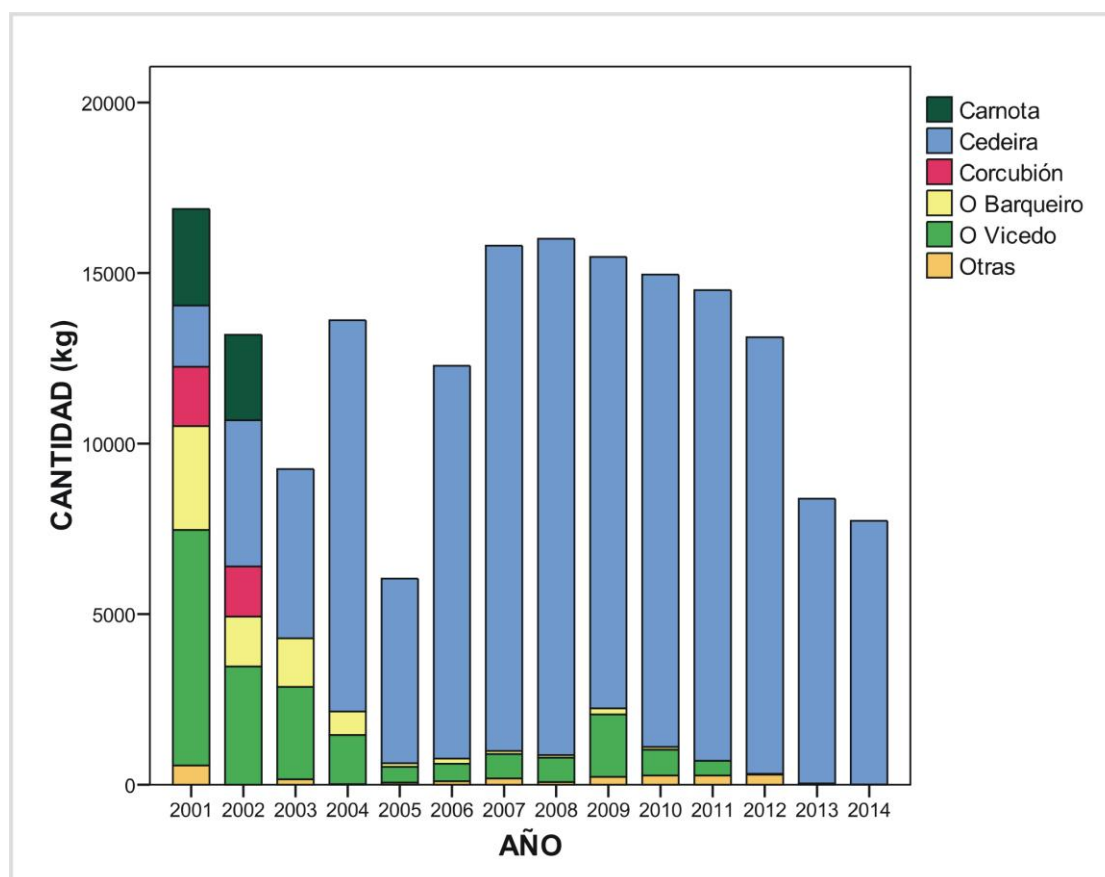


Figura 1.3. Capturas de *D. trunculus* según los datos de primera venta registrados por la Plataforma Tecnológica de Pesca de la Xunta de Galicia

1.1.3. Marcadores moleculares

1.1.3.1. Características generales y tipos de marcadores

Los marcadores moleculares se definen como caracteres heredables que muestran variación distinguible empleando técnicas moleculares. En el área de la acuicultura los marcadores constituyen herramientas fundamentales para estudios de diversidad genética, asignación de paternidades, identificación de especies o construcción de mapas de ligamiento (Liu y Cordes, 2004). La elección del marcador más adecuado se basa principalmente en la especie objeto de estudio (especie modelo/no modelo) y en los objetivos específicos del trabajo a desarrollar (Liu y Cordes, 2004). Así mismo, el equipamiento necesario y el coste son factores a tener en cuenta.

Los progresos en el campo de la biología molecular y la bioquímica han permitido el desarrollo de diferentes tipos de marcadores moleculares tanto proteicos como de ADN. Dentro del grupo de los proteicos destacan las alozimas, los primeros marcadores genéticos empleados, que son variantes alélicas de proteínas que se

diferencian en carga, tamaño o forma debido a sustituciones aminoacídicas, reflejando así la variación genética (Liu y Cordes, 2004; Schlöterer, 2004). Sin embargo, estos marcadores presentan varios inconvenientes entre los que destacan su expresión diferencial según tejido y estadio de desarrollo o que las proteínas pueden desnaturalizarse durante la elaboración de productos manufacturados. En el grupo de los marcadores moleculares de ADN existe una mayor diversidad. Por un lado destacan los denominados polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs: *Restriction Fragment Length Polymorphisms*; Botstein y col., 1980), que se originan como consecuencia de cambios nucleotídicos en la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción, o los polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPDs: *Random Amplified Polymorphic DNA*; Williams y col., 1990), en la que se amplifican fragmentos de ADN empleando un único cebador de secuencia aleatoria. Por otro lado, los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLPs: *Amplified Fragment Length Polymorphisms*; Vos y col., 1995) combinan características de los dos marcadores anteriores y se originan como consecuencia de la amplificación selectiva de fragmentos obtenidos tras la digestión del ADN con enzimas de restricción. Los marcadores basados en los polimorfismos del ADN mitocondrial (ADNmt), que incluyen tanto mutaciones puntuales como inserciones y deleciones (Avisé, 2004) también constituyen un marcador genético ampliamente utilizado. Por último, destacan los microsatélites, también conocidos como repeticiones cortas en tándem (STRs: *Short Tandem Repeats*) o repeticiones de secuencia simple (SSRs: *Simple Sequence Repeats*), así como los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs: *Single Nucleotide Polymorphisms*), causados por cambios de una única base nucleotídica en una posición concreta del genoma.

1.1.3.2. RFLPs

Los marcadores RFLPs se basan en la detección de diferencias de longitud de fragmentos de ADN obtenidos tras la digestión con enzimas de restricción (Botstein y col., 1980). Estas enzimas reconocen secuencias de ADN específicas y catalizan el corte de la doble hélice. Tradicionalmente, los fragmentos se analizaban mediante la técnica *Southern blot*, pero esta metodología ha sido reemplazada por técnicas basadas en la amplificación mediante PCR (Liu y Cordes, 2004). En este caso se realiza la digestión de un fragmento de ADN previamente amplificado y el producto de la digestión se determina mediante electroforesis (PCR-RFLPs). La amplificación previa del fragmento que contiene el polimorfismo supone una mayor sensibilidad,

especificidad y facilita el análisis, ya que el patrón de digestión se visualiza en geles de agarosa.

La variación de los patrones de restricción generados puede estar producida por diferencias en una o varias bases nucleotídicas, dando lugar a la pérdida o ganancia de uno o más sitios de restricción. Asimismo, la inserción o delección de un fragmento de ADN también puede alterar el patrón de restricción esperado. Estos cambios genotípicos generan variabilidad en el número y/o tamaño de los fragmentos de restricción, lo que se traduce en diferencias de movilidad en geles de agarosa. Los patrones de restricción obtenidos tanto por la digestión del ADN directamente como del producto de PCR pueden variar entre individuos, poblaciones y especies. Esta variación proporciona información útil tanto para el análisis de genética de poblaciones como para la identificación de especies. La principal ventaja de estos marcadores es su carácter codominante. Sin embargo, presentan un nivel de polimorfismo relativamente bajo y normalmente es necesario conocer la secuencia nucleotídica para el diseño de cebadores o de sondas de hibridación (Liu y Cordes, 2004).

1.1.3.3. *ADN mitocondrial*

El ADNmt constituye un marcador molecular ampliamente utilizado en estudios de genética de poblaciones, identificación de especies y filogeografía (Avice y col., 1987; Moritz y col., 1987; Hebert y col., 2003; Galtier y col., 2009). Tradicionalmente, la variación del ADNmt se analizó en base a los patrones de fragmentos generados por enzimas de restricción pero actualmente es común el empleo de secuenciación directa de alguno de los genes o de la región control.

El ADNmt es una molécula circular, cerrada y bicatenaria, aunque existen excepciones, como en algunos Cnidarios donde el ADNmt está subdividido en dos moléculas lineales o en ciertas especies de Hidrozoos en los que es una única molécula lineal (Warrior y Gall, 1985). En los animales, el ADNmt es generalmente una molécula pequeña (15-20 kb) (Boore, 1999). Las diferencias de tamaño observadas entre especies se deben a menudo a secuencias repetidas presentes en la región de control (Wolstenholme, 1992). En general, el ADNmt contiene 37 genes que codifican para los ARNs ribosómicos 12S y 16S, para 22 tipos de ARN transferente, y para 13 subunidades proteicas, que en su mayoría corresponden a subunidades de diferentes complejos multienzimáticos implicados en la cadena de transporte electrónico y en la fosforilación oxidativa, como las subunidades I, II y III de la citocromo c oxidasa o el

citocromo b. Además, el ADNmt contiene una región variable no codificante con elementos de control de la replicación y la transcripción (Moritz y col., 1987; Boore, 1999).

Una de las características que presenta el ADNmt es que su tasa de mutación es mayor que la del ADN nuclear de copia única (Brown y col., 1979). Esta rápida evolución de la secuencia se debe en parte a la baja eficiencia de reparación de la ADN polimerasa, que a diferencia de la ADN polimerasa nuclear, carece de actividad correctora de errores (Hartl y Clark, 2007). La mayor parte de las diferencias entre las secuencias se deben a mutaciones puntuales, con un sesgo hacia las transiciones respecto a las transversiones (Avice, 2004). Otras propiedades habitualmente atribuidas al ADNmt son una tasa de mutación constante y un modo de evolución prácticamente neutral (Galtier y col., 2009). En general, se espera que la mayor parte de las mutaciones que sufre el ADNmt sean neutras o deletéreas, y las mutaciones adaptativas sean poco frecuentes. Las mutaciones deletéreas serán eliminadas por selección purificadora y sin afectar en gran medida a la diversidad, por lo que los niveles de divergencia observados reflejarían el tiempo de divergencia. Sin embargo, diferentes estudios sugieren que estas propiedades no siempre se cumplen, ya que se han encontrado evidencias de selección positiva y tasas de mutación heterogéneas (Ballard y Whitlock, 2004; Galtier y col., 2009).

El genoma mitocondrial es haploide y presenta generalmente herencia clonal, sin recombinación genética, lo que implica que todo el genoma se comporta como un único *locus* con múltiples alelos. Además, su tamaño efectivo es cuatro veces menor que el de los marcadores nucleares, lo que hace que sea más sensible al efecto de la deriva genética (Ferguson y col., 1995; Ballard y Whitlock, 2004). En general, el ADNmt de animales se transmite predominantemente a través de la línea materna, aunque existen excepciones. Una de las excepciones la constituyen algunas especies de moluscos bivalvos, en las cuales se ha descrito un modo de herencia característico denominado herencia doblemente uniparental (DUI: *Double Uniparental Inheritance*). Este tipo de herencia se ha observado en alrededor de cincuenta especies de bivalvos pertenecientes a seis familias diferentes: Hyriidae (Hoeh y col., 2002), Margaritiferidae (Curole and Kocher, 2005), Mytilidae (Fisher y Skibinski, 1990; Skibinski y col., 1994a, b; Zouros y col., 1994a, b; Vargas y col., 2015), Solenidae (Okazaki y Ueshima, no publicado; números de acceso GenBank AB065374 y AB065375), Unionidae (Liu y col., 1996; Hoeh y col., 2002; Curole y Kocher, 2005) y Veneridae (Passamonti y Scali, 2001; Plazzi y col., 2015) y probablemente también Nuculanidae (Boyle y Etter, 2013).

Asimismo, Theologidis y col. (2008) describieron este tipo de herencia en la coquina *D. trunculus*.

Este tipo de herencia se caracteriza por presentar dos genomas mitocondriales, uno transmitido a través de los óvulos (tipo F) a todos los descendientes y otro transmitido a través de los espermatozoides (tipo M) sólo a los descendientes macho. Así, las hembras adultas son homoplásmicas para el tipo F, mientras que los machos son heteroplásmicos, con el ADNmt tipo F predominando en el tejido somático y el tipo M en las gónadas (Figura 1.4) (Skibinski y col., 1994a, b; Zouros y col., 1994a, b; Liu y col., 1996). En el mejillón *Mytilus edulis*, Sutherland y col. (1998) han demostrado que durante la fertilización todos los oocitos reciben mitocondrias de la línea paterna (tipo M), pero éstas son eliminadas en el transcurso de las primeras 24-48 horas después de la fertilización si el cigoto va a ser hembra. Si por el contrario, el cigoto va a ser un macho, las gónadas presentarán mitocondrias de la línea paterna (tipo M) y el resto de los tejidos somáticos mitocondrias de la línea materna (tipo F) (Garrido-Ramos y col., 1998). Una propiedad relevante que se ha demostrado en algunas especies con este tipo de herencia es la existencia de recombinación entre el ADNmt tipo F y tipo M (Ladoukakis y Zouros, 2001).

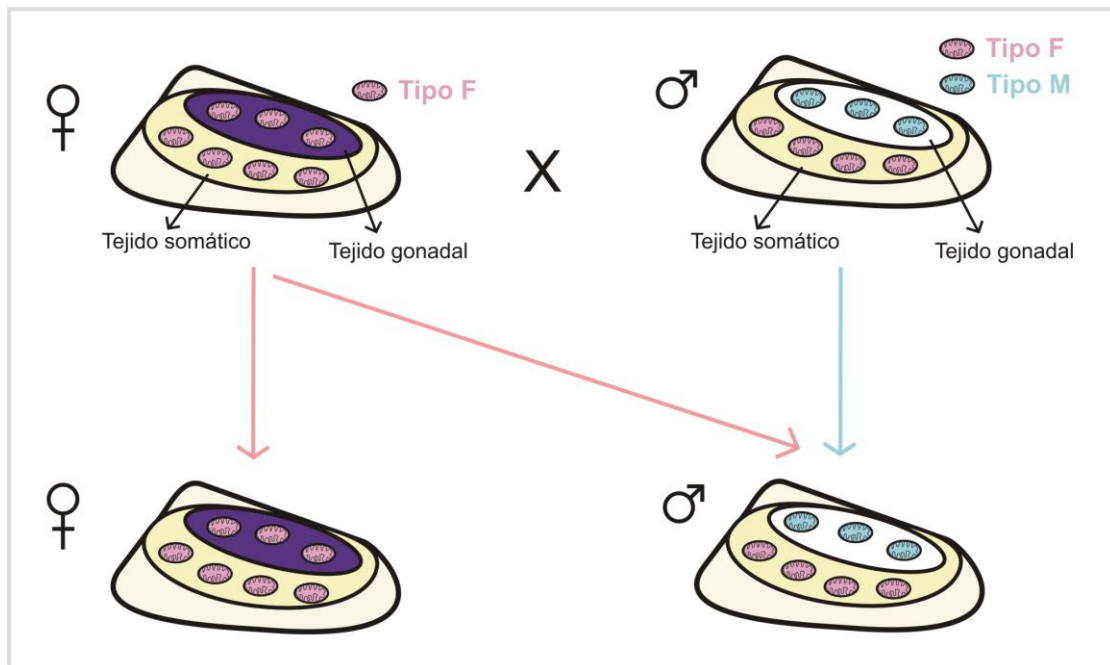


Figura 1.4. Esquema de la herencia doblemente uniparental (DUI) y distribución de los genomas mitocondriales por tipo de tejido y sexo

La detección de este tipo de herencia en bivalvos puede resultar difícil y en ocasiones existe un cierto nivel de incertidumbre sobre la ausencia real de DUI cuando no se

consigue demostrar su existencia en las especies investigadas (Theologidis y col., 2008). Existen diferentes factores que provocan la existencia de falsos negativos en la detección de DUI. Es posible que la elevada divergencia existente entre los genomas F y M impida que la misma pareja de cebadores amplifique ambos genomas. Además, el genoma F puede interferir con la amplificación del M en preparaciones de gónada de macho que normalmente están contaminadas con células somáticas. También existe la posibilidad de que la divergencia entre los dos genomas sea tan pequeña que se interprete como una aparente homoplasia. Esto sucedería en el caso de un evento de masculinización relativamente reciente (Theologidis y col., 2008; Zouros, 2013). Ocasionalmente, el genoma F invade la ruta de transmisión de las mitocondrias M y asume el papel del genoma M, pasando a ser transmitido a través de los espermatozoides. Este fenómeno se denomina masculinización del genoma F (Hoeh y col., 1996).

A pesar de que las características particulares del genoma mitocondrial de algunos bivalvos pueden hacer su análisis más complejo, existen varias propiedades generales del ADNmt que justifican su uso como marcador molecular. Entre ellas destaca su pequeño tamaño, su fácil manipulación o el hecho de que esté presente en múltiples copias por célula (Hartl y Clark, 2007). Asimismo, la existencia de regiones variables flanqueadas por regiones conservadas, apropiadas para el diseño de cebadores, hace que éstas puedan ser fácilmente amplificadas por PCR. Por estos motivos, el ADNmt constituye una de las soluciones más sencillas y baratas de estudiar genéticamente una nueva especie (Galtier y col., 2009). El único inconveniente técnico podría estar relacionado con la amplificación indeseada de genes mitocondriales insertados en el genoma nuclear (pseudogenes nucleares mitocondriales) (Bensasson y col., 2001).

1.1.3.4. *Microsatélites*

Los microsatélites son secuencias cortas de ADN constituidas por motivos de 2 a 6 pb repetidos en tándem (Chambers y MacAvoy, 2000). También se conocen como repeticiones cortas en tándem (STRs: *Short Tandem Repeats*) o repeticiones de secuencia simple (SSRs: *Simple Sequence Repeats*). Los microsatélites se han encontrado tanto en organismos procariotas como eucariotas y tanto en regiones codificantes como no codificantes, aunque son más abundantes en estas últimas. Sin embargo, el tipo y secuencia de los motivos repetidos, así como, la longitud y distribución de los microsatélites varía entre los diferentes grupos taxonómicos (Tóth y col., 2000; Neff y Gross, 2001; Ross y col., 2003; Chistiakov y col., 2006). Estos

marcadores son considerados, en general, marcadores de ADN selectivamente neutros. No obstante, se ha demostrado que participan en la regulación de diferentes procesos biológicos como la recombinación, la replicación, la transcripción y la traducción, entre otros (Li y col., 2002).

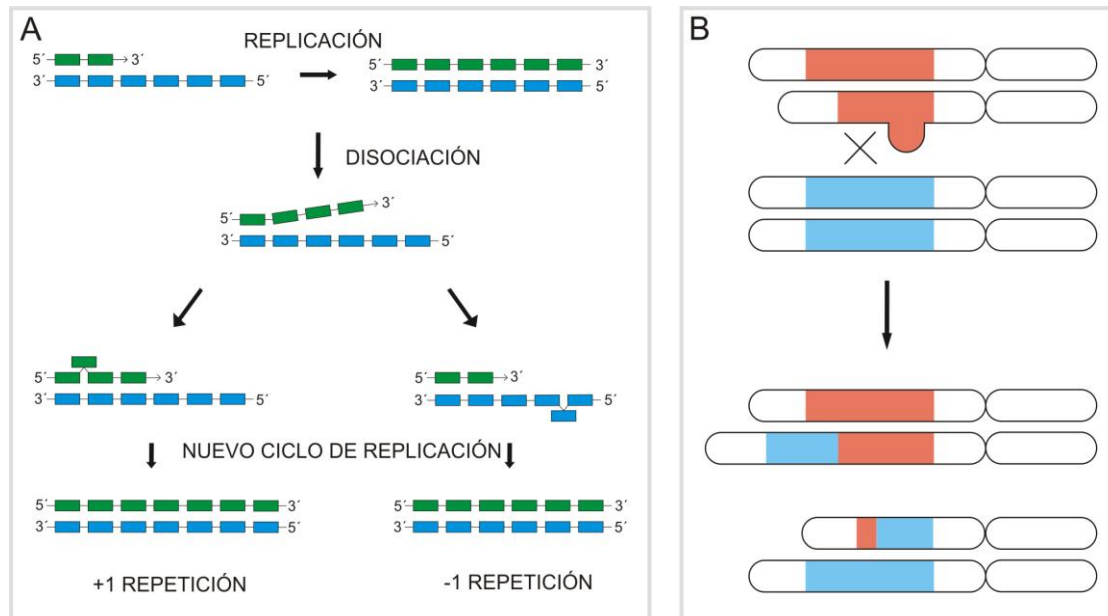


Figura 1.5. A. Deslizamiento durante la replicación del ADN. La cadena molde contiene 6 repeticiones del motivo microsatélite representado por rectángulos (azul en la cadena molde y verde en la de nueva síntesis). B. Entrecruzamiento desigual entre cromosomas homólogos. Las regiones naranjas y azules corresponden a las secuencias de los motivos microsatélite. (Modificado de Oliveira y col., 2006)

La principal característica de los microsatélites es su hipermutabilidad y, por consiguiente, su alta variabilidad en especies y poblaciones (Chistiakov y col., 2006). En eucariotas, la tasa de mutación estimada ($10^{-2} - 10^{-6}$ por *locus* y generación) es muy superior a la del ADN de copia única (10^{-9} por nucleótido y generación) (Ellegren, 2000). Esta inestabilidad da lugar al elevado polimorfismo de estos marcadores, que se manifiesta principalmente como variaciones en el número de unidades de repetición. Los dos principales mecanismos implicados en la elevada tasa mutacional de estas regiones serían el deslizamiento de cadena durante la replicación y la recombinación desigual (Schlöterer, 2000; Li y col., 2002; Chistiakov y col., 2006; Oliveira y col., 2006). El deslizamiento de cadena durante la replicación del ADN da lugar a que la cadena molde o la de nueva síntesis cambien sus posiciones relativas, formándose un bucle en una de ellas, que de no repararse conduce a la pérdida o ganancia de unidades de repetición del microsatélite. Si el bucle se forma en la hebra molde se origina un menor número de repeticiones mientras que si éste se forma en la hebra naciente el número de repeticiones del microsatélite aumenta (Figura 1.5. A). La

recombinación origina cambios en la longitud del microsatélite por entrecruzamiento desigual o conversión génica. La secuencia repetitiva del microsatélite puede originar la formación de un bucle, de forma que, durante la recombinación se producirá un intercambio desigual de fragmentos de ADN, dando lugar a la pérdida de unidades de repetición en una molécula de ADN y a la ganancia en la otra (Figura 1.5. B).

Para describir la evolución de los microsatélites se han propuesto diferentes modelos. El modelo de infinitos alelos (IAM: *Infinite Alleles Model*) propone que cada mutación genera un alelo nuevo por pérdida o ganancia de un número variable de repeticiones (Kimura y Crow, 1964). El modelo de mutación paso a paso (SMM: *Stepwise Mutational Model*) postula que cada mutación crea un alelo nuevo por pérdida o ganancia de una única unidad de repetición del microsatélite (Kimura y Ohta, 1978). Además de estos dos modelos existen otros dos modelos con características intermedias. Uno de ellos es el modelo de k alelos (KAM: *K-Allele Model*) que asume que existe un número k de posibles alelos y que cada alelo tiene la misma probabilidad de mutar a cualquiera de los otros k-1 estados alélicos (Crow y Kimura, 1970). Por último, el modelo de mutación en dos fases (*Two Phase Model*) considera que un porcentaje del total de mutaciones implican pérdidas o ganancias de más de una unidad de repetición (Di Rienzo y col., 1994). Según los modelos propuestos, excepto el IAM, los alelos pueden mutar y dar lugar a otros alelos existentes en la población, originando homoplasia, es decir, alelos que son idénticos en estado pero no por descendencia. La existencia de homoplasia está ligada a una reducción en el número de alelos así como de la heterocigosidad. Sin embargo, debido a la elevada variabilidad de los microsatélites, la homoplasia no debería representar un problema en los análisis de genética de poblaciones (Estoup y col., 2002).

Los *loci* microsatélite son uno de los marcadores más empleados. Su elevado grado de polimorfismo, un patrón de herencia mendeliano, así como, su expresión codominante y la abundancia que presentan en los genomas, los hacen adecuados en el análisis de genética de poblaciones así como en estudios de paternidad y parentesco. La principal limitación de estos marcadores es que deben ser desarrollados *de novo* para cada especie, ya que es preciso conocer las secuencias que flanquean a los motivos microsatélite para el diseño de cebadores.

1.1.4. Aplicaciones de los marcadores moleculares

1.1.4.1. Análisis de la variación genética en poblaciones naturales

La biodiversidad consiste en la variedad de ecosistemas, especies, poblaciones dentro de especies y diversidad genética dentro de las mismas (Frankham y col., 2002). La diversidad biológica del planeta está disminuyendo rápidamente como consecuencia directa o indirecta de acciones humanas que comprometen la habilidad de los organismos para adaptarse a los cambios ambientales (Frankham y col., 2002; Saura y Faria, 2011). Entre las amenazas más comunes en el medio marino destacan la sobreexplotación, la degradación del hábitat o la introducción de especies exóticas (Saura y Faria, 2011). Estas acciones promueven cambios en las presiones selectivas que con el tiempo pueden provocar pérdida de variación genética y comprometer la supervivencia de las especies a largo plazo (Allendorf y col., 2008).

El desarrollo de estrategias de conservación de las especies se ha centrado tradicionalmente en el análisis de los factores abióticos del hábitat y en la relación entre las especies, con el objetivo de conocer los requerimientos de las mismas. Sin embargo, más recientemente, trabajos realizados en el campo de la conservación han mostrado que los estudios ecológicos pueden beneficiarse enormemente de la combinación con evaluaciones genéticas de los recursos (Geist, 2010).

La conservación de la diversidad genética constituye un objetivo primordial en la gestión de poblaciones, tanto naturales como en cautividad. A corto plazo la variación genética es relevante para el mantenimiento del éxito reproductivo y, por tanto, de la productividad de las poblaciones, mientras que a largo plazo contribuye al potencial adaptativo de las mismas (Frankham y col., 2002; Allendorf y col., 2008). Existen diferentes factores que afectan a la diversidad genética y su combinación determina los niveles de variación existentes. La mutación y la migración contribuyen a un incremento de la variación, mientras que la selección equilibradora la mantiene, y la deriva genética y la selección direccional la eliminan (Frankham y col., 2002). El balance entre las fuerzas que mantienen la diversidad genética varía en función del tamaño de las poblaciones. En las poblaciones grandes la selección tiene un efecto importante, mientras que en las pequeñas es la deriva genética el factor más relevante (Frankham y col., 2002). Por tanto, el estudio de la diversidad genética mediante el empleo de marcadores moleculares y los factores que la afectan es fundamental para la conservación y uso de los recursos acuáticos.

Además de la diversidad genética, para la conservación y gestión de las especies es fundamental el estudio de la diferenciación entre poblaciones, ya que proporciona información sobre la magnitud de intercambio genético entre ellas así como de la historia evolutiva de las mismas (Allendorf y col., 2013). En el medio marino existen varios factores que contribuyen a la ausencia de diferenciación genética entre las poblaciones. Entre ellos destacan la ausencia de barreras geográficas en los océanos, el elevado flujo génico, los elevados tamaños poblacionales de las especies así como el hecho de que estas presenten generalmente una fase larvaria planctónica (Ward, 2000; Launey y col., 2002). Sin embargo, existen cada vez más estudios en los que se demuestra la existencia de subdivisión poblacional en especies marinas. Se han descrito varios factores que favorecen la diferenciación poblacional en estas especies, como los cambios bruscos en gradientes de temperatura y salinidad, corrientes hidrodinámicas que favorecen la retención larvaria o factores históricos como los cambios climáticos y glaciaciones del Pleistoceno, entre otros (Infante y Manchado, 2007). Por tanto, puesto que las especies marinas pueden dividirse en poblaciones locales genéticamente distintas o *stocks*, estos deben considerarse para el desarrollo de estrategias óptimas de gestión del recurso (Ward, 2000). Además, la existencia de poblaciones aisladas y pequeñas resulta de gran importancia en el campo de la conservación puesto que la deriva genética y la pérdida de variación en las mismas provoca un incremento de endogamia que puede conducir a la extinción de la especie (Geist, 2010). Asimismo, la evaluación de la diferenciación genética resulta esencial para valorar el riesgo genético de los programas de repoblación (Ward, 2006) así como del traslado de individuos de unas áreas a otras (Johnson, 2000).

1.1.4.2. *Evaluación de los aspectos genéticos del cultivo en criadero*

Existe un elevado número de organismos marinos, como los moluscos bivalvos, que se encuentran amenazados debido a la pérdida o degradación de sus hábitats, la presencia de competidores invasivos y/o patógenos, así como, la sobreexplotación a la que se encuentran sometidos. Esta sobreexplotación está relacionada con una creciente demanda de los recursos, lo que ha provocado que los bancos naturales de muchas especies se exploten cerca, o en algunos casos por encima, de los límites máximos sostenibles. Dada esta situación, existe un especial interés en desarrollar estrategias que permitan el incremento de la producción y la gestión sostenible del recurso. En este marco, los programas de repoblación de los bancos naturales de muchas especies se están convirtiendo en una práctica común a nivel mundial (Gaffney, 2006).

La recuperación de las poblaciones naturales de moluscos bivalvos puede llevarse a cabo siguiendo diferentes estrategias, entre las que se incluyen, la repoblación con individuos adultos, la siembra de juveniles (semilla) o la liberación de larvas en el medio (Lallias y col., 2010a). La producción de semilla en criadero presenta varias ventajas entre las que destacan la fiabilidad, la capacidad de satisfacer la demanda y la posibilidad de obtener variedades genéticas con características biológicas mejoradas (Helm y Bourne, 2006).

Desde un punto de vista genético, las prácticas de cultivo en criadero se relacionan, en ocasiones, con un incremento en la tasa de endogamia así como con fenómenos como la deriva genética o la selección. Este hecho podría tener consecuencias negativas en la diversidad genética de la semilla provocando cambios significativos en la población natural (Ward, 2006). Por este motivo los análisis de paternidad de la semilla producida en criadero son esenciales, puesto que proporcionan información útil para el mantenimiento de la diversidad genética y la prevención de endogamia en la semilla obtenida. Además de los análisis de paternidad, el estudio de las relaciones de parentesco entre los individuos empleados en criadero es fundamental para minimizar la reproducción entre individuos emparentados con el objetivo de reducir el riesgo de depresión endogámica y pérdida de variación genética por deriva genética (Montgomery y col., 1997).

Los análisis de paternidad y parentesco mediante marcadores moleculares se basan en inferir el grado de similitud existente entre individuos. El objetivo de los análisis de paternidad es identificar a los progenitores basándose en el hecho de que un progenitor debe compartir con sus descendientes un alelo para cada *locus* analizado (alelo idéntico por descendencia). En el caso de los análisis de parentesco se realiza una estimación de la proporción de alelos idénticos por descendencia que comparten los individuos para conocer la relación de parentesco entre ellos (Martínez y Fernández, 2007).

1.1.4.3. *Identificación de especies*

En las últimas décadas, el incremento del comercio internacional de marisco y productos del mar ha originado la necesidad de autenticar diferentes especies. Con ello se pretende mejorar la seguridad de los consumidores y asegurar la composición de los productos marinos así como evitar el fraude comercial que conlleva la

sustitución ilegal de una especie por otra de menor valor económico (Bossier, 1999; Civera, 2003; Rasmussen y Morrissey, 2008). Además de los efectos negativos que puede tener en el ámbito comercial, la incorrecta identificación de las especies puede reducir la eficacia de los programas de gestión y conservación de especies marinas diseñados para proteger los hábitats oceánicos y las especies en peligro (Civera, 2003; Teletchea y col., 2005).

Tradicionalmente, la identificación de las diferentes especies de moluscos bivalvos se ha basado en criterios morfológicos. Este proceso requiere de un análisis minucioso de los caracteres que, a menudo, muestran gran variabilidad puesto que están sujetos a influencias ambientales. Por este motivo, la correcta identificación de las especies resulta difícil para no especialistas. Además, en muchas ocasiones, el procesado de estos productos (disección, cocción o envasado) provoca la pérdida de sus características especie-específicas, como las valvas, lo que dificulta o imposibilita su identificación.

Los marcadores moleculares constituyen una herramienta muy eficaz para la autenticación y trazabilidad de las especies. Los primeros marcadores diseñados con este fin estaban basados en proteínas. Sin embargo, los procesos de manufacturación que incluyen algún tipo de tratamiento térmico (cocción, congelado, ahumado o enlatado) provocan la desnaturalización proteica, por lo que se comenzaron a diseñar métodos basados en el ADN, que es más resistente a la degradación (Rehbein, 1990; Sotelo y col., 1993). A bajas temperaturas el ADN tiende a ser muy estable, con muy poca degradación detectable durante la vida útil del producto (Cerdeira y Koppen, 1998). Sin embargo, se degrada rápidamente durante el procesado a elevadas temperaturas, como la esterilización, generando fragmentos de 500 pb o inferiores (Chikuni y col., 1990; Unseld y col., 1995). Para la identificación de especies se puede emplear tanto ADN nuclear como mitocondrial. Los marcadores basados en el mitocondrial son ampliamente usados por presentar una mayor abundancia respecto al nuclear y porque su topología circular parece ofrecer una mayor resistencia a la degradación (Borgo y col., 1996; Bottero y Lomonaco, 2006).

1.1.5. Estudios genéticos en *D. trunculus*

A pesar de la importancia económica que tiene la coquina para el sector marisquero gallego y de ser una especie sobreexplotada, los estudios genéticos en este organismo son muy escasos. La mayor parte de los trabajos se han centrado en la

descripción y estudio del cariotipo de la especie (Cornet y Soulard, 1990; González-Tizón y col., 1998; Martínez y col., 2002) así como en el análisis de elementos móviles y ADN satélite (Plohl y Cornudella, 1996, 1997; Plohl y col., 2002; Petrovic y Plohl, 2005; Petrovic y col., 2009; Satovic y Plohl, 2013). Además, Theologidis y col. (2008) han estudiado el modo de herencia del ADNmt y han detectado la existencia de DUI en esta especie. Por otra parte, se ha descrito un método de identificación molecular de *D. trunculus* basado en la amplificación de un fragmento del gen de la subunidad ribosomal 18S (Espiñeira y col., 2009). Más recientemente, se ha desarrollado un método para la identificación y diferenciación molecular de *D. trunculus* frente a otras especies del género *Donax* basado en la amplificación del marcador nuclear 5S ADNr (Pereira y col., 2012).

1.2. OBJETIVOS

Dada la escasez de estudios genéticos y de evaluaciones poblacionales en la coquina *D. trunculus*, en este trabajo se persiguió como objetivo general caracterizar y evaluar la variación genética de este recurso en localidades de la Península Ibérica. Para ello se desarrollaron marcadores moleculares nucleares y mitocondriales. Los datos obtenidos ayudarán a mejorar la gestión y conservación, así como, incrementar la producción de este bivalvo. Además, puesto que en la costa gallega la coquina ha sufrido un importante descenso en su producción, llegando incluso a desaparecer en algunos bancos naturales, se ha planteado su recuperación a través de prácticas de cultivo en criadero. Por este motivo, este trabajo también contempló analizar reproductores empleados en criadero y la semilla obtenida para estudiar el impacto genético que pueden generar las estrategias de cultivo. Por último, dado que existen cuatro especies del género *Donax* en la costa de la Península Ibérica, se planteó desarrollar marcadores que permitan su discriminación mediante métodos moleculares.

Los objetivos específicos de este trabajo fueron:

1. Desarrollar marcadores moleculares tipo microsatélite específicos en *D. trunculus* a partir de genotecas enriquecidas y diseñar PCRs *multiplex* que faciliten su análisis.
2. Evaluar la diversidad genética y estructura poblacional en localidades de la Península Ibérica mediante marcadores microsatélite y de ADN mitocondrial.
3. Evaluar la variación genética de un proceso de obtención de semilla en criadero a través de asignación de paternidades y estimación de relaciones de parentesco.
4. Desarrollar marcadores moleculares especie-específicos para la identificación de cuatro especies del género *Donax* presentes en la Península Ibérica.

Desarrollo de marcadores microsatélite y PCRs *multiplex*

2.1. INTRODUCCIÓN

Los microsatélites son uno de los marcadores moleculares más empleados en estudios de diversidad genética y estructura poblacional. Se han usado tanto en invertebrados, como el calamar *Loligo forbesi* (Shaw y col., 1999) o la esponja *Crambe crambe* (Duran y col., 2004), como en vertebrados superiores, como los lobos marinos *Arctocephalus gazella* y *A. tropicalis* (Wynen y col., 2000) o el tiburón *Negaprion brevirostris* (Feldheim y col., 2001). En las últimas décadas se desarrollaron este tipo de marcadores en diferentes especies de moluscos bivalvos como almejas (Yasuda y col., 2007; An y col., 2009; Pereira y col., 2010; Chacón y col., 2013; Borrell y col., 2014), berberechos (Martínez y col., 2009), mejillones (Presa y col., 2002; Gardeström y col., 2008; Li y col., 2011), navajas (Arias-Pérez y col., 2012), ostras (Launey y col., 2002; Li y col., 2003) o pectínidos (Arias y col., 2010; 2011). En el género *Donax*, recientemente se han identificado veinte *loci* microsatélite para *Donax deltoides*, una especie endémica de Australia (Miller y col., 2012). Sin embargo, este tipo de marcadores no han sido descritos en *D. trunculus*.

Los marcadores microsatélite son altamente variables, abundan en los genomas, presentan herencia codominante, son reproducibles y se analizan fácilmente mediante PCR. Estas características los convierten en una valiosa herramienta molecular. Su principal desventaja es que, aunque existen casos de amplificación interespecífica (Scribner y col., 1996; Eackles y King, 2002; Sekino y col., 2003a; An y col., 2009), generalmente deben ser aislados *de novo* para cada especie, porque las regiones flanqueantes donde hibridan los cebadores no se encuentran conservadas habitualmente.

Para la búsqueda e identificación de marcadores microsatélite se han desarrollado diferentes metodologías. El método tradicional para el aislamiento de *loci* microsatélite consiste en la construcción de genotecas parciales, rastreo de clones recombinantes mediante hibridación *Southern-blot* y secuenciación de los clones positivos. Este método requiere un elevado grado de experiencia, a la vez que puede resultar tedioso y económicamente costoso. En especies cuyos genomas presentan una elevada proporción de microsatélites esta metodología resulta adecuada. Sin embargo, en especies con baja frecuencia de microsatélites en sus genomas el rendimiento puede ser muy bajo (Zane y col., 2002).

Existen otras estrategias de aislamiento de microsatélites que se basan en la hibridación y clonación de las bandas generadas a partir de otros marcadores moleculares como RAPDs, AFLPs o ISSRs (*Inter Simple Sequence Repeats*) (Morgante y col., 1996; Lunt y col., 1999; Lian y col., 2001), de forma que se evita la construcción de una genoteca y rastreo de los fragmentos. Sin embargo, el rendimiento de estos métodos suele ser bajo.

Los microsatélites también se pueden identificar a partir de las secuencias disponibles en las bases de datos de ADN, principalmente en bases de datos de marcadores de secuencia expresada (ESTs: *Expressed Sequence Tags*), las cuales se secuencian de forma aleatoria a partir de genotecas de ADN complementario. Los *loci* identificados a partir de ESTs presentan un elevado potencial informativo, especialmente si se localizan en genes de secuencia conocida. Vasemägi y Primmer (2005) han empleado *loci* microsatélite aislados a partir de ESTs para la búsqueda de señales de selección divergente en el salmón atlántico. Estos autores han puesto de manifiesto la utilidad de estos marcadores para el descubrimiento de polimorfismos funcionales, especialmente en organismos no modelo. La expansión o contracción de un microsatélite localizado en la secuencia de un gen puede afectar directamente al producto génico correspondiente y generar cambios fenotípicos (Li y col., 2004). Además, diversos estudios han demostrado que los *loci* identificados a partir de ESTs presentan un mayor éxito de amplificación interespecífica, ya que existe mayor probabilidad de que las secuencias flanqueantes al microsatélite estén conservadas (Gupta y col., 2003; Chagné y col., 2004; Coulibaly y col., 2005). Con el empleo de esta metodología se reducen costes y se evita la construcción de genotecas, por lo que ha sido ampliamente utilizada en diferentes organismos, como es el caso de algunos moluscos bivalvos (Jones y col., 2011; Wang y col., 2011). Sin embargo, es de difícil aplicación en organismos poco estudiados a nivel genómico e ignora los microsatélites localizados en intrones. Otra limitación de este método es que los cebadores diseñados para una secuencia microsatélite pueden fallar en la amplificación a partir de ADN genómico, ya que las secuencias ESTs se obtienen a partir de ADN complementario y los cebadores pueden hibridar en la región limítrofe entre un exón y un intrón (Hu y col., 2004). Además, los microsatélites identificados a partir de ESTs tienden a mostrar una tasa de polimorfismo menor que los aislados a partir de genotecas genómicas (Eujayl y col., 2002; Chabane y col., 2005).

Recientemente, las tecnologías NGS (*Next Generation Sequencing*) han revolucionado el campo de la biología molecular proporcionando de forma rápida y efectiva gran

cantidad de datos genómicos. Por esto motivo, constituyen un procedimiento adecuado para el desarrollo de diferentes marcadores moleculares, como microsatélites, reduciendo el tiempo y el coste necesario para su identificación (Santana y col., 2009). Esta metodología ha permitido aislar *loci* microsatélite en especies no modelo en las que los datos genómicos son escasos, como es el caso de diferentes organismos marinos (Miller y col., 2012; Kang y col., 2013; Plough y Marko, 2014; Yu y col., 2014). La principal limitación de esta metodología es el pequeño tamaño de los fragmentos secuenciados lo cual puede provocar la pérdida de los motivos microsatélite, ya que es probable que se localicen próximos a alguno de los extremos de la secuencia impidiendo el diseño de cebadores para las regiones flanqueantes (Abdelkrim y col., 2009).

Uno de los métodos más utilizados para aislar microsatélites consiste en la construcción de genotecas enriquecidas. En este caso, a diferencia de las genotecas parciales descritas anteriormente, los fragmentos empleados para construir la genoteca ya son ricos en motivos microsatélite. El incremento en *loci* microsatélite se consigue con el uso de técnicas como la *primer extension* (Ostrander y col., 1992; Paetkau, 1999) o la hibridación selectiva (Karagoyozov y col., 1993; Billote y col., 1999; Hamilton y col., 1999). En el primer caso, los fragmentos de ADN genómico se insertan en un vector de fago para obtener ADN de cadena simple que sirve como molde en una reacción de *primer extension* de un oligonucleótido con motivos microsatélite, de forma que sólo se formará ADN de doble cadena en los clones que contengan el motivo buscado. En el caso de la hibridación selectiva se usan sondas microsatélite marcadas para la selección de fragmentos, que previamente a su clonación se amplifican por PCR. Los protocolos de enriquecimiento mediante hibridación selectiva se han usado ampliamente para el aislamiento de *loci* microsatélite en moluscos bivalvos (Reece y col., 2004; Evans y col., 2006; Martínez y col., 2009; Arias y col., 2010; Pereira y col., 2010).

Previamente a la elección de los motivos microsatélite para los cuales se va a realizar el enriquecimiento de la genoteca es recomendable evaluar la abundancia de diferentes motivos en el genoma de la especie a estudiar, ya que existen diferencias marcadas en la frecuencia de microsatélites entre los genomas de las especies (Tóth y col., 2000). Además, generalmente, el éxito en el aislamiento de *loci* microsatélite varía con su frecuencia en el genoma (Zane y col., 2002). La presencia y abundancia de los motivos microsatélite se puede examinar mediante *dot-blot*, una técnica de hibridación

que permite conocer la presencia o ausencia de la secuencia deseada en un genoma, así como realizar una estima de su abundancia en el mismo.

Una vez que los motivos microsatélite han sido aislados se realiza su amplificación mediante PCR. Para ello, se diseñan cebadores que hibriden en las regiones flanqueantes al motivo microsatélite y se optimizan las condiciones de PCR para conseguir una amplificación satisfactoria. La amplificación y genotipado de los diferentes *loci* microsatélite es un proceso relativamente sencillo pero cuando se estudian múltiples *loci* en muestras de un elevado número de individuos el análisis puede resultar económicamente costoso y lento. El desarrollo de PCRs *multiplex* (Chamberlain y col., 1988), es decir, la amplificación simultánea de varios *loci*, ayuda a incrementar el rendimiento del proceso. Además, de esta forma se reduce también la manipulación repetitiva de las muestras y, por tanto, el riesgo de errores en el manejo de las mismas (Porta y col., 2006b). Los *loci* amplificados en una misma reacción *multiplex* se pueden diferenciar por el tamaño de los alelos. Para diferenciar los *loci* con tamaños de alelos solapantes incluidos en una misma reacción *multiplex* se emplean cebadores marcados con diferentes fluorocromos. El desarrollo de PCRs *multiplex* requiere, generalmente, de múltiples intentos para optimizar la condiciones de reacción. Debe tenerse en cuenta que cuando se amplifican varios *loci* de forma simultánea, estos mostrarán diferencia en el rendimiento porque compiten por la enzima y los nucleótidos (Henegariu y col., 1997; Markoulatos y col., 2002). Por tanto, resulta imprescindible realizar diferentes pruebas de optimización tanto de las concentraciones de los cebadores y sales ($MgCl_2$) como de la temperatura de hibridación. Inicialmente, se emplean concentraciones equimolares de todos los cebadores incluidos en la *multiplex* (Markoulatos y col., 2002). En caso de detectarse una amplificación desigual de los diferentes *loci* se modifica la concentración de los cebadores hasta alcanzar una amplificación homogénea de todos los marcadores. Por último, uno de los factores más importantes en el proceso de optimización es la temperatura de hibridación. En general, se recomienda que los *loci* incluidos en la misma reacción posean temperaturas de hibridación similares, ya que esto simplificaría en gran medida el proceso de optimización para lograr una amplificación uniforme de los marcadores (Butler y col., 2001; Holleley y Geerts, 2009). Pero a pesar de requerir una extensa optimización para conseguir la correcta amplificación de los *loci* coamplificados, las PCR *multiplex* son de gran utilidad para el genotipado de múltiples *loci* en muestras amplias y existen numerosos estudios que emplean este tipo de PCRs para la coamplificación de *loci* microsatélite en moluscos bivalvos (Taris y col., 2005; Wang y col. 2010; Mura y col., 2012; Chacón y col., 2013).

En este capítulo se describe la identificación y caracterización por primera vez de marcadores microsatélite en *D. trunculus* mediante la construcción de dos genotecas enriquecidas así como, la optimización de PCRs *multiplex* para agilizar el proceso de genotipado en estudios poblacionales.

2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.2.1. Material de estudio y extracción de ADN

Los individuos de *D. trunculus* utilizados proceden de la localidad de Vilarrube (A Coruña). En el laboratorio se diseccionó cada uno de los ejemplares y se guardó el músculo aductor, el pie y la masa visceral en etanol 96% para su conservación y posterior utilización.

La extracción de ADN se realizó siguiendo uno de los dos protocolos que se describen a continuación en función de la aplicación del ADN extraído. El ADN utilizado para la construcción de las genotecas enriquecidas se extrajo según el protocolo descrito por Fernández-Tajes y Méndez (2007) para moluscos bivalvos, por proporcionar mayor cantidad de ADN purificado. Para cada individuo se introdujo un fragmento de 20 mg de músculo aductor en 400 µl de tampón de lisis (tris(hidroximetil)aminometano [Tris] 1 M, ácido etilendiaminotetraacético [EDTA] 0,2 M, N-Laurylsarcosin 2,5%) y se homogenizó el tejido por fragmentación. Se añadieron 5 µl de proteinasa K (200 mg/ml) y se mantuvo toda la noche a 60 °C. Transcurrido este tiempo, se incubó la mezcla con 4 µl de RNasa libre de DNasa (2 mg/ml) a 37 °C durante 1 h. A continuación, se añadieron 150 µl de tampón de precipitación (acetato amónico 3 M pH 6,0), se dejaron las muestras en hielo durante 10 min, y se centrifugaron a 13 000 rpm durante 10 min, recogiendo el sobrenadante. La precipitación del ADN se realizó añadiendo 400 µl de isopropanol. Tras centrifugar a 13 000 rpm durante 3 min, se eliminó el sobrenadante por decantación. El ADN se lavó con 1 ml de etanol al 70% y, después de centrifugar a 13000 rpm 6 min y eliminar el etanol, los tubos se dejaron secar al aire y el ADN se resuspendió en 30 µl de 1xTE (Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8). El ADN extraído se cuantificó en un gel de agarosa al 1% en 1xTAE (Tris-acetato 40 mM pH 8, EDTA 1 mM) mediante la comparación con un marcador de concentración conocida (Marker III; Roche). Para ello, se cargó en el gel 1 µl de ADN extraído de cada individuo mezclado con 1 µl de tampón de carga (azul de bromofenol 0,25%, azul de xianol 0,25% y glicerol al 30% en 1xTAE) y 4 µl de H₂O Milli-Q®. En el caso del marcador se cargó 1 µl de marcador III, 1 µl de tampón de carga y 4 µl de H₂O Milli-Q®. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio 0,5 µg/ml en 1xTAE durante 30 min y se visualizaron en el sistema de captación de imagen Gel Doc™ XR (Bio-Rad).

La extracción de ADN de los individuos empleados en el análisis de los marcadores microsatélite, se realizó empleando un método rápido y sencillo basado en el desarrollado por Walsh y col. (1991). Para cada individuo, se introdujo un fragmento de pie (~1 mm³ conservado en etanol 96%) en 100 µl de Chelex 100™ al 10% en H₂O Milli-Q® estéril y se incubó a 100 °C durante 20 min. Tras la incubación, se centrifugaron las muestras durante 2 min a 13 000 rpm y se recogió el sobrenadante. La cuantificación del ADN extraído se realizó en un espectofotómetro nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.).

2.2.2. Detección de secuencias microsatélite mediante dot-blot

Se realizaron hibridaciones con las sondas (AC)₁₀, (ACC)₇, (GAA)₇, (TGA)₇, (CGAT)₆ y (GATA)₆ marcadas con digoxigenina en el extremo 5' con el objetivo de determinar la abundancia relativa de los diferentes motivos microsatélite. Para ello, el ADN genómico de dos individuos se depositó en cantidades decrecientes en puntos discretos de una membrana de nylon cargada positivamente (GE HealthCare Life Sciences). Se prepararon diluciones de ADN a 100 ng/µl, 50 ng/µl, 25 ng/µl, 12,5 ng/µl y 6,25 ng/µl, y se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 min, seguidos de otros 5 min en hielo. La membrana se lavó en 2x citrato sódico salino (20xSSC: NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M) y, después de secarla, se depositaron sobre ella 2 µl de cada una de las diluciones. El ADN se fijó a la membrana mediante irradiación con 4000 µJ/cm² de luz ultravioleta (UV) durante 5 min y se incubó en 20 ml de solución de prehibridación (5xSSC, dodecilsulfato sódico [SDS] 0,02%, N-lauril sarcosine sal sódica [LSS] 0,01%, agente bloqueante de Roche 0,3%) a 37 °C durante 30 min. A continuación, se añadieron 10 pmol de sonda y se incubó a 37 °C durante 3h. Posteriormente, se lavó 2 veces la membrana en 2xSSC con 0,1% de SDS a temperatura ambiente durante 5 min, y otras dos veces en 0,5xSSC con 0,1% de SDS a 30 °C durante 15 min. Después, se realizó un lavado de 5 min en tampón de lavado (tween 20 al 0,3% en tampón 1 [ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5]) y se incubó la membrana en tampón 2 (agente bloqueante de Roche al 1% en tampón 1) durante 30 min.

La sonda hibridada se detectó mediante quimioluminiscencia. Para ello, se llevó a cabo una incubación en 75 mU/ml de anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (Roche) en tampón 2 durante 30 min. El exceso de anticuerpo se eliminó mediante un lavado de 20 min en tampón de lavado. La membrana se equilibró manteniéndola en tampón 3 (Tris-HCl 0,1 N pH 9,5, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 50 mM) durante 5 min, y se incubó en una solución 1:100 del sustrato quimioluminiscente

CSPD (Roche) en tampón 3 otros 5 min. A continuación, se introdujo la membrana en una bolsa de hibridación y se incubó a 37 °C durante 15 min. La película *Medical X-Ray Film* (Fujifilm) se expuso a la membrana durante 15 min a temperatura ambiente. El revelado se realizó introduciendo la película en Revelador G 150 (Agfa) durante 5 min, en H₂O 5 min, y en Fijador G 354 (Agfa) otros 5 min.

Con el objetivo de rehibridar la membrana con las demás sondas, se eliminó la sonda hibridada mediante un breve lavado en agua Milli-Q® estéril, dos lavados en NaOH 0,2 M con 0,1% de SDS durante 15 min a 37 °C, seguidos de un lavado de 5 min en 2xSSC. A continuación, se procedió a la hibridación según el protocolo descrito anteriormente.

2.2.3. Construcción de genotecas enriquecidas en secuencias microsatélite

Se construyeron dos genotecas enriquecidas, una para los motivos GT, ATC y CTGT (genoteca I) y otra para ACC y GATA (genoteca II). La elección de los motivos se basó en experimentos de hibridación *dot-blot* realizados previamente en el laboratorio en otras especies de moluscos bivalvos y en base a los resultados obtenidos en los *dot-blot* realizados para *D. trunculus* en este trabajo.

Las genotecas enriquecidas se construyeron siguiendo el protocolo descrito por Billote y col. (1999) con algunas modificaciones. El ADN genómico de un individuo extraído mediante el método Fernández-Tajes y Méndez (2007) se digirió con dos enzimas de restricción diferentes, *AluI* y *RsaI* (Roche Applied Science), para obtener un *smear* entre 400 y 1500 pb. En ambos casos, las digestiones se realizaron en un volumen final de 50 µl conteniendo 2 µg de ADN genómico, 20 U de enzima, 0,5 µl de seroalbúmina bovina 100x (BSA; New England BioLabs) y 5 µl del tampón recomendado para cada enzima (10x). Las reacciones se mantuvieron a 37 °C durante toda la noche y, al día siguiente, se añadieron 20 U de enzima y 0,5 µl de BSA 100x, que se dejaron actuar otras 3 h. Los tubos se pusieron en hielo y los tamaños obtenidos tras la digestión se comprobaron al realizar una electroforesis en gel de agarosa al 1% en 1xTAE en el que se cargaron 10 µl del producto de la digestión.

De las dos enzimas testadas, se seleccionó *AluI* por generar un *smear* continuo y de tamaño adecuado. Al producto digerido con esta enzima se ligaron los adaptadores diseñados por Edwards y col. (1996), RSA21 5'-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3' y RSA25 5'-pTAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA-3'. La reacción de ligación se llevó

a cabo en un volumen final de 200 µl con 1 µg de ADN digerido, 0,01 µM de cada adaptador, 4,2 U de ADN ligasa T4 (Promega) y 100 µl del tampón 2x suministrado con la enzima. La mezcla se incubó toda la noche a 4 °C y, posteriormente, se realizó una PCR para comprobar la ligación y aumentar el número de copias obtenidas. La reacción se realizó con 5 µl del producto de la ligación, 1,5 mM de MgCl₂, 0,25 mM de cada dNTP, 1 µM del adaptador RSA 21, 1x tampón de la polimerasa (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM pH 8,3) y 0,625 U de *Taq* ADN polimerasa (Roche). El programa de PCR empleado consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 1 min; 25 ciclos de 40 s a 94 °C, 1 min a 60 °C y 2 min a 72 °C; seguidos de una extensión final a 72 °C durante 5 min. La amplificación se comprobó en un gel de agarosa al 2% en 1xTAE.

Las secuencias con motivos microsatélite se seleccionaron mediante hibridaciones con sondas oligonucleotídicas marcadas con biotina en el extremo 5', [GT]₈, [ATC]₁₀ y [CTGT]₆ para la genoteca I y [ACC]₇ y [GATA]₆ para la genoteca II. Este paso de hibridación se realizó de una forma ligeramente distinta en cada una de las genotecas. En la genoteca I las tres sondas oligonucleotídicas se hibridaron de forma conjunta, mientras que en el caso de la genoteca II cada una de las sondas se hibridó por separado. En ambos casos la hibridación se realizó con 100 µl de producto de PCR que se llevaron a 500 µl con H₂O Milli-Q[®] estéril y se calentó la mezcla a 95 °C durante 15 min. Tras la desnaturalización del producto de PCR, se añadieron 3 µl de cada una de las sondas biotiniladas (20 µM), 13 µl de 20xSSC y 5 µl de 10% SDS, y se mantuvo la mezcla de hibridación 20 min a temperatura ambiente. La captura de las secuencias que hibridaron se realizó con las partículas magnéticas *Streptavidin MagneSphere[®] Paramagnetic Particles* (Promega). Para ello, se eliminó el sobrenadante comercial de un vial de partículas magnéticas (0,6 ml) mediante un soporte magnético. A continuación, se lavaron las partículas tres veces en 300 µl de 0,5xSSC con 0,1% SDS y se resuspendieron en 100 µl de la misma solución. Se añadió el producto de la hibridación y, tras 10 min a temperatura ambiente, el tubo con la mezcla se colocó en el soporte magnético para eliminar el sobrenadante. Se llevaron a cabo tres lavados en 300 µl de 0,1xSSC con 0,1% SDS y para recuperar los fragmentos capturados se añadieron en dos pasos, 100 µl y 150 µl de H₂O Milli-Q[®], recuperando el sobrenadante en ambos casos con la ayuda del soporte magnético. Con el objetivo de aumentar la cantidad de ADN, 2 µl de producto hibridado se amplificaron mediante PCR con el cebador RSA21 empleando la mezcla de reacción descrita con anterioridad. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 1 min; 20 ciclos de 40 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 40 s a 72 °C; y una extensión final a 72 °C durante 5 min. En el caso de la genoteca

II los productos de PCR de las dos sondas se juntaron antes de llevar a cabo la clonación.

El producto de PCR obtenido en las amplificaciones se clonó en el vector plasmídico yT&A[®] utilizando el yT&A[®] *cloning vector kit* (Yestearn Biotech), siguiendo el mismo protocolo para ambas genotecas. La mezcla de clonación se realizó en un volumen final de 10 µl, que contenía 3 µl de producto de amplificación, 1x tampón de ligación A (Yestearn Biotech), 1x tampón de ligación B (Yestearn Biotech), 50 ng de vector yT&A[®] y 1 U de ADN ligasa T4, y se incubó 20 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 2 µl de la mezcla a un vial de 100 µl de células competentes de *Escherichia coli* ECOS[™] DH5α (Yestearn Biotech) conservadas a -80 °C. La transformación se llevó a cabo mediante choque térmico, manteniendo las células a 42 °C durante 45 segundos e inmediatamente después se pasaron a hielo. A continuación, se añadieron 600 µl de medio LB (1% bactotripton, 0,5% extracto de levadura, 1% NaCl) y se sembraron las células en placas Petri con medio LBA (medio LB con 1,5% bactoagar y ampicilina 100 mg/ml), impregnado con 80 µl de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) 100 mM y 80 µl de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) 50 mg/ml, incubándose a 37 °C durante toda la noche. Los clones recombinantes se detectaron mediante la selección blanco-azul que permiten el IPTG y el X-Gal (Sambrook y Russell, 2001).

2.2.4. Secuenciación de clones e identificación de secuencias microsatélite

Para comprobar la presencia y el tamaño del inserto en las colonias seleccionadas se realizó una PCR con los cebadores universales M13F y M13R. Parte de la biomasa de las colonias se recogió con puntas de pipeta estériles y se resuspendió en 30 µl de H₂O Milli-Q[®] autoclavada. La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 12,5 µl con 5 µl del clon recombinante, 1x de tampón de la polimerasa, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,6 µM de cada cebador y 0,3 U de Taq ADN polimerasa. El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 10 min; 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 1 min a 72 °C; seguidos de una extensión final a 72 °C durante 10 min. Tras verificar la amplificación y el tamaño de los fragmentos en un gel de agarosa al 2% en 1xTAE, los productos de PCR se secuenciaron en un secuenciador automático ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems) en los *Servicios de Apoyo á Investigación de la Universidade da Coruña*. Los clones recombinantes que mostraron una amplificación positiva se conservaron a -80 °C por si fuera necesario repetir la amplificación y la secuenciación de los mismos. Para ello,

a cada clon se le añadieron 200 µl de medio líquido LBA y se dejaron crecer a 37 °C con agitación durante toda la noche. Al día siguiente se añadieron 200 µl de glicerol 40% y se congelaron a -80 °C.

Las secuencias obtenidas se editaron con el programa BioEdit v.7.0.9.0. (Hall, 1999) para eliminar las secuencias plasmídicas flanqueantes y las secuencias de los adaptadores. A continuación, las secuencias se compararon todas contra todas mediante un análisis *blastn* empleando el programa MicroFamily-WIN (Meglécz, 2007) y se descartaron las secuencias redundantes.

Los motivos microsatélite se identificaron utilizando el programa Tandem Repeats Finder (Benson, 1999). Una secuencia se consideró microsatélite cuando presentaba al menos cuatro repeticiones dinucleotídicas, tres repeticiones trinucleotídicas o dos repeticiones tetranucleotídicas. La tasa de éxito para cada una de las genotecas se calculó como el porcentaje de secuencias únicas con motivos microsatélite en el total de secuencias analizadas. Una vez identificadas las secuencias microsatélite, se diseñaron cebadores específicos para las regiones flanqueantes empleando el programa Primer 3 (Rozen y Skaletsky, 2000).

2.2.5. Amplificación de loci microsatélite mediante PCR monolocus

Los cebadores diseñados se amplificaron inicialmente en una muestra de 30 individuos de la localidad de Vilarrube. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 12,5 µl con 50 ng de ADN extraído con Chelex, 0,3 U de *Taq* ADN polimerasa (Roche Applied Science), 1x tampón de polimerasa, 0,2 mM de cada dNTP, 0,24 µM de cada cebador y concentraciones finales de 1,5 – 2,5 mM de MgCl₂ según la pareja de cebadores utilizados en la amplificación. El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min; 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 56 – 60 °C y 30 s a 72 °C; seguidos de una extensión final a 72 °C durante 10 min. La temperatura de hibridación de los cebadores se optimizó realizando las amplificaciones en un termociclador de gradiente My Cycler™ (Bio-Rad) cuando fue necesario. La existencia de polimorfismo en los loci microsatélite amplificados satisfactoriamente se determinó en un gel de agarosa al 3% en 0,5xTBE (Tris-Borato 45 mM, EDTA 1 mM) teñido con bromuro de etidio.

En los loci microsatélite que resultaron polimórficos se procedió a la caracterización de los alelos en unos 30 individuos, repitiendo la amplificación con uno de los cebadores

marcado en el extremo 5' con el fluorocromo 6-FAM. Los productos de PCR obtenidos se separaron en un secuenciador automático ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems) de los *Servicios de Apoyo á Investigación de la Universidad da Coruña* y se analizaron empleando el programa GeneMapper v.3.7 (Applied Biosystems) para visualizar los cromatogramas obtenidos en el secuenciador automático, corroborar la existencia de polimorfismo y descartar aquellos *loci* que generasen patrones de amplificación complejos. Al mismo tiempo se determinó el tamaño de los alelos y el genotipo de cada uno de los individuos. Con el objetivo de automatizar el proceso de genotipado, se crearon plantillas (bins) en el programa con los alelos de cada uno de los *loci*. Los genotipos asignados por el programa de forma automática se revisaron y editaron manualmente para comprobar y rectificar posibles errores en la identificación de alelos y añadir los alelos nuevos a la plantilla. Los datos del genotipado se exportaron en formato Excel y utilizando el programa Microsatellite Toolkit (Park, 2001) se generaron los formatos de archivos necesarios para los análisis estadísticos posteriores.

2.2.6. Análisis de la diversidad genética

A partir de los genotipos identificados para cada uno de los individuos analizados y utilizando el programa Genepop v.4.03 (Belkhir y col., 2004) se calculó para cada *locus* el número de alelos (N_a), la heterocigosidad observada (H_o) y la heterocigosidad esperada insesgada (H_e) de Nei (1978). Con el programa Genetix v.4.03 se calculó el coeficiente de endogamia (F_{is}) de Weir y Cockerham (1984) por *locus*. Los tests para determinar la bondad de ajuste de las proporciones genotípicas al equilibrio Hardy-Weinberg (HW) y a las condiciones de equilibrio de ligamiento se llevaron a cabo con el programa Genepop v.4.0. (Rousset, 2008). El nivel de significación se determinó mediante el método de cadena de Markov empleando 10 000 *dememorizations*, 5000 *batches* y 5000 iteraciones por *batch*. La presencia de alelos nulos se determinó con el programa MicroChecker v.2.2.0.3. (Van Oosterhout y col., 2004) y su frecuencia se estimó según el estimador 1 de Brookfield (ecuación 4; Brookfield, 1996). En los casos en que se llevaron a cabo tests estadísticos múltiples, los valores de significación se ajustaron utilizando la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989).

2.2.7. Diseño y optimización de PCRs multiplex

Los *loci* polimórficos caracterizados previamente se utilizaron para el diseño de PCRs *multiplex* empleando el programa Multiplex Manager (Holleley y Geerts, 2009). Este

programa usa los datos de heterocigosidad esperada, número y rango de tamaño de los alelos, temperatura de hibridación y secuencia de los cebadores para cada *locus* con el objetivo de agrupar los marcadores microsatélite en el menor número de reacciones posible, maximizando el espacio entre marcadores con el mismo fluorocromo y minimizando la diferencia en la temperatura de hibridación de los cebadores dentro de una misma reacción. El programa asigna fluorocromos diferentes (6-FAM, VIC, NED o PET) a los *loci* que presentan alelos de tamaño solapante. Se ejecutó el programa con 19 marcadores, y se limitó a diez el número máximo de *loci* por reacción y a 30 pb la distancia mínima entre *loci* con el mismo fluorocromo. Las combinaciones propuestas por el programa se modificaron manualmente para minimizar el número de reacciones y maximizar el número de *loci* marcados con 6-FAM, puesto que ya se disponía de cebadores marcados con este fluorocromo empleados para la caracterización individual de los *loci*.

Las PCRs *multiplex* diseñadas se optimizaron con el fin de alcanzar una amplificación óptima y homogénea de todos los *loci* incluidos en la misma reacción. Para ello se partió de una concentración inicial de los cebadores de 0,2 μ M para cada *locus*, que se modificó individualmente hasta conseguir que todos los marcadores presentasen una señal de intensidad similar. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 12,5 μ l con 80 ng de ADN extraído con Chelex, 1x *Qiagen Multiplex PCR Master Mix* (*HotStarTaq*®, tampón, $MgCl_2$ 3 mM y mezcla de dNTPs) y la mezcla de cebadores correspondiente. El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 15 min; 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 1,5 min a 57 – 60 °C, 1,5 min a 72 °C; seguidos de una extensión final de 10 min a 72 °C. El producto de amplificación se verificó en un gel de agarosa al 2% en 1xTAE y, a continuación, los fragmentos se separaron en un secuenciador automático y se visualizaron con el programa GeneMapper v.3.7 (Applied Biosystems).

Una vez optimizadas, las PCRs *multiplex* se amplificaron en un total de 50 individuos de la localidad de Vilarrube y los productos de PCR se genotiparon empleando GeneMapper. La tasa de éxito de cada PCR *multiplex* se calculó como el número de individuos amplificados y genotipados correctamente para el total de *loci* frente al número total de individuos amplificados. La variación genética se estimó como se describe en el apartado 6 de este capítulo.

2.3. RESULTADOS

Los ensayos *dot-blot* realizados con siete sondas microsatélite mostraron hibridación positiva en todos los casos excepto con el motivo trinucleotídico (GAA)₇. La mayor intensidad de hibridación se obtuvo con la sonda dinucleotídica (AC)₁₀, la trinucleotídica (ACC)₇ y la tetranucleotídica (GATA)₆ (Figura 2.1). Estas tres sondas fueron elegidas para realizar el enriquecimiento de las genotecas y, en base a resultados previos de nuestro laboratorio, también se emplearon ATC y CTGT. Así, se construyeron dos genotecas (genoteca I: motivos GT, ATC, CTGT; genoteca II: motivos: ACC, GATA).

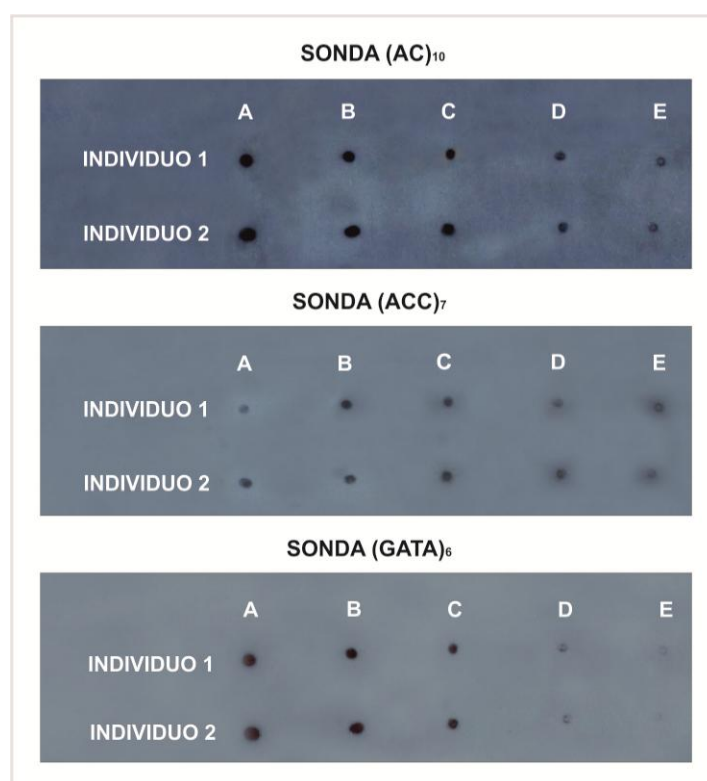


Figura 2.1. Hibridación *dot-blot* con las sondas (AC)₁₀, (ACC)₇ y (GATA)₆ en diluciones de ADN a 100 ng/μl (A), 50 ng/μl (B), 25 ng/μl (C), 12,5 ng/μl (D) y 6,25 ng/μl (E)

La Tabla 2.1 muestra las características de los clones obtenidos a partir de cada una de las genotecas construidas. Se obtuvieron un total de 783 clones recombinantes, de los cuales se secuenciaron 589. De éstos, se descartaron 89 por tener secuencias idénticas a otras ya obtenidas, variando la tasa de redundancia entre un 14% (genoteca II) y un 19% (genoteca I). De las 500 secuencias únicas, 198 presentaron al

menos un motivo microsatélite, oscilando la tasa de éxito por genoteca entre un 44% (genoteca I) y un 26% (genoteca II).

Noventa y siete secuencias resultaron adecuadas para el diseño de cebadores por disponer de secuencias flanqueantes. Al probar las 97 parejas de cebadores diseñadas, 25 no amplificaron, a pesar de las diferentes pruebas realizadas para optimizar la reacción, y 30 mostraron un patrón complejo en el análisis con uno de los cebadores marcados. De las 42 parejas con amplificación exitosa, 19 dieron lugar a patrones polimórficos mientras que 23 mostraron patrones monomórficos al analizar los geles de agarosa al 3% en 0,5xTBE.

Tabla 2.1. Características de los clones obtenidos en las genotecas construidas

Clones	Genoteca I	Genoteca II	Total
Recombinantes	377	406	783
Secuenciados	245	344	589
Con secuencias únicas	199	301	500
Con motivos microsatélite	107	91	198
Idóneos para el diseño de cebadores	29	68	97

La Tabla 2.2 muestra los motivos microsatélite polimórficos identificados en las genotecas así como la secuencia de los cebadores y las condiciones de amplificación para cada uno de los *loci*. Siguiendo la clasificación propuesta por Chambers y MacAvoy (2000) los microsatélites polimórficos identificados se clasificaron como puros (13), puros interrumpidos (4) y compuestos interrumpidos (2). Estos *loci* presentaron tanto motivos para los que se llevó a cabo el enriquecimiento de las genotecas como otros motivos distintos (AT, AAC, TAT y GGAT). alguna de las repeticiones para las que se realizó el enriquecimiento se encontraron representadas por sus formas reversas complementarias así como por permutaciones de los mismas (GT: CA, TG, AC; CTGT: GACA, TGTC, AGAC, ACAG). Sin embargo, los motivos ACC y GATA, las repeticiones microsatélite para las que se realizó el enriquecimiento en la genoteca II, no están presentes en ninguno de los *loci* polimórficos identificados (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Características de los 19 marcadores microsatélite identificados

Locus	Motivo microsatélite	Secuencia cebadores (5'-3')	MgCl₂ (mM)	T^a (°C)
Dtr17	(AT) ₄ GT CAT AA AT AT AA AT(TG) ₁₁	F: ACTCACAGCCTTGTGGGATG R: GGCGGCGTGACTTAGTTAAT	2,0	58
Dtr20	(AC) ₂ GC (AC) ₁₄	F: CACACAAGGGGACTCTTAAAATG R: AACAGACTGGGCAAACACAA	1,5	60
Dtr43	(ACAG) ₄	F: TCACAAGGTATGGTCGGACA R: CAGAGTATGCTGGGCGATTT	1,5	60
Dtr46	(CA) ₈	F: TAAGTCCCTAAAGCGCAAGG R: CAGGTATTTATGGCGCTGCT	1,5	60
Dtr47	(TG) ₈	F: GCCAAAGGAAAGAGGATAAATG R: TGCTAACTCATCTGTGAGTGACTATG	2,0	60
Dtr53	(GT) ₃ AT (GT) ₃ AGA GG GT GG AT TT (GT) ₁₁	F: GGAGAGCAAATGTTATGACAAG R: ACATGGGCTTAGGACAGGTT	2,5	60
Dtr70	(TGTC) ₅	F: CCCCTTTTCTGGGCATTATT R: TGCGCTTACAAGAAATGTGG	1,5	60
Dtr86	(GACA) ₄	F: TCAAATTAGAGAGCGGACCAA R: CCATATTGTGGTATGGGAGACA	1,5	60
Dtr90	(AGAC) ₅ ATAT (GGAT) ₂ GGTT GGAC (AGAC) ₃	F: GTGTGAAAACTGTTAGAGTTATCGTG R: AGATGCTGCAGCCCTTTAGT	1,5	60
Dtr108	(GACA) ₄	F: TGTCTTCTACTGCGGATTTCGT R: GGGCTAATTGCTTTGCTCCT	1,5	60
Dtr117	(ATC) ₇	F: TCTCAACAGACAATTAGAGGTAGGC R: TGCCCGCTGTTCTTATTAGG	1,5	60
Dtr126	(GACA) ₄ GATT (GACA) ₃ GATG (GACA) ₂	F: CCCAATGGCCTCAAATAGTG R: CCCATCATGATCAGTAATCACC	1,5	60
Dtr174	(ACAG) ₃	F: GCAATGTAAAGTTGCGTTGTG R: CTTTGCTTTTCTTTGGTACCTAGC	1,5	60
Dtr199	(ACAG) ₅	F: GGACACATGATGATAAAGGACA R: TCCATCCCAGTGCTACTTACC	1,5	60
Dtr273	(TAT) ₃	F: TGCGTTTGAGGCATTTGTTA R: GCGGCTAATACTGTTGTTTGT	1,5	60
Dtr285	(TG) ₁₀ GG GG TG GG (TG) ₇	F: CCAAACAGCATTGTTTTCAA R: TTTCTAATGGAAAATCCAAACA	2,0	56
Dtr301	(ATC) ₅	F: CAGCGATTGTTGACGAAAGA R: CGCAAACCACATCGTGAATA	1,5	60
Dtr323	(AAC) ₃	F: AGAACAACCACACAACAGCCTA R: AGATGATTTGGCGGAAGATG	1,5	60
Dtr371	(GACA) ₃	F: TGCACATCTACATTTCCCTTGA R: CCCGCAAACAAAGTTTTGAG	1,5	60

La Tabla 2.3 muestra las características de los 19 *loci* microsatélite amplificados en una muestra de 30 individuos de Vilarrube. El número de alelos por *locus* varió entre 2 y 17, y el tamaño de los mismos osciló entre 72 y 238 pb. Los valores de heterocigosidad observada y esperada variaron entre 0 y 0,714, y entre 0,078 y 0,950, respectivamente, y los valores *Fis* entre -0,102 y 1. Tras la corrección secuencial de Bonferroni nueve *loci* se encontraron en equilibrio HW mientras que los 10 restantes mostraron un déficit significativo de heterocigotos. El análisis con el programa MicroChecker sugirió la existencia de alelos nulos en estos *loci*, con frecuencias que variaron entre 0,109 y 0,277. Ninguno de los *loci* analizados presentó evidencias de desequilibrio de ligamiento tras la corrección secuencial de Bonferroni.

Tabla 2.3. Diversidad genética de los *loci* microsatélite analizados en la localidad de Vilarrube

<i>Locus</i>	<i>N</i>	<i>Na</i>	<i>R</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>AN</i>	<i>Fis</i>
Dtr17	25	8	104-238	0,400	0,718**	0,178	0,448
Dtr20	20	17	86-126	0,500	0,940**	0,217	0,474
Dtr43	27	5	109-126	0,519	0,549	-	0,057
Dtr46	25	8	92-104	0,440	0,831**	0,206	0,476
Dtr47	28	6	122-132	0,714	0,649	-	-0,102
Dtr53	23	6	200-417	0,348	0,749**	0,222	0,541
Dtr70	29	6	92-116	0,690	0,750	-	0,082
Dtr86	30	11	72-108	0,667	0,886**	0,109	0,251
Dtr90	28	5	126-152	0,536	0,693	-	0,230
Dtr108	30	5	107-149	0,200	0,353*	-	0,438
Dtr117	29	9	131-161	0,690	0,807	-	0,148
Dtr126	29	6	184-195	0,414	0,720**	0,172	0,430
Dtr174	27	10	79-135	0,185	0,652**	0,277	0,720
Dtr199	29	5	170-193	0,241	0,226	-	-0,068
Dtr273	22	3	108-113	0,136	0,458**	0,215	0,707
Dtr285	17	16	86-132	0,588	0,950**	0,174	0,388
Dtr301	27	7	120-138	0,482	0,596	-	0,195
Dtr323	26	3	129-165	0,192	0,271	-	0,294
Dtr371	25	2	119-120	0,000	0,078*	-	1,000

Na: número de alelos; *R*: rango de tamaño de los alelos en pares de bases; *Ho*: heterocigosidad observada; *He*: heterocigosidad esperada insesgada de Nei; *AN*: frecuencia de alelos nulos; (*): significativo para $\alpha=0,05$; (**): significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni.

Las PCRs *multiplex* se desarrollaron teniendo en cuenta los valores de heterocigosidad esperada y número y rango de tamaño de los alelos obtenidos en la muestra de individuos de Vilarrube (Tabla 2.3). Inicialmente, el programa Multiplex Manager proporcionó tres combinaciones de *loci* que agrupaban 17 de los 19 *loci*

microsatélite polimórficos. Una de las combinaciones incluyó ocho *loci* (Dtr53, Dtr70, Dtr86, Dtr126, Dtr174, Dtr199, Dtr285 y Dtr323), otra cinco (Dtr43, Dtr46, Dtr47, Dtr108 y Dtr117), y una tercera cuatro (Dtr20, Dtr90, Dtr273 y Dtr301). Los *loci* Dtr20, Dtr46 y Dtr285 no amplificaron de forma satisfactoria durante el proceso de optimización de las PCRs *multiplex*, por lo que fueron eliminados de las combinaciones correspondientes. El *loci* Dtr371, no incluido inicialmente por el programa, se incluyó manualmente para aumentar el número de marcadores en cada una de las reacciones, agrupándose de esta forma un total de 15 *loci* en tres reacciones *multiplex* (Figura 2.2).

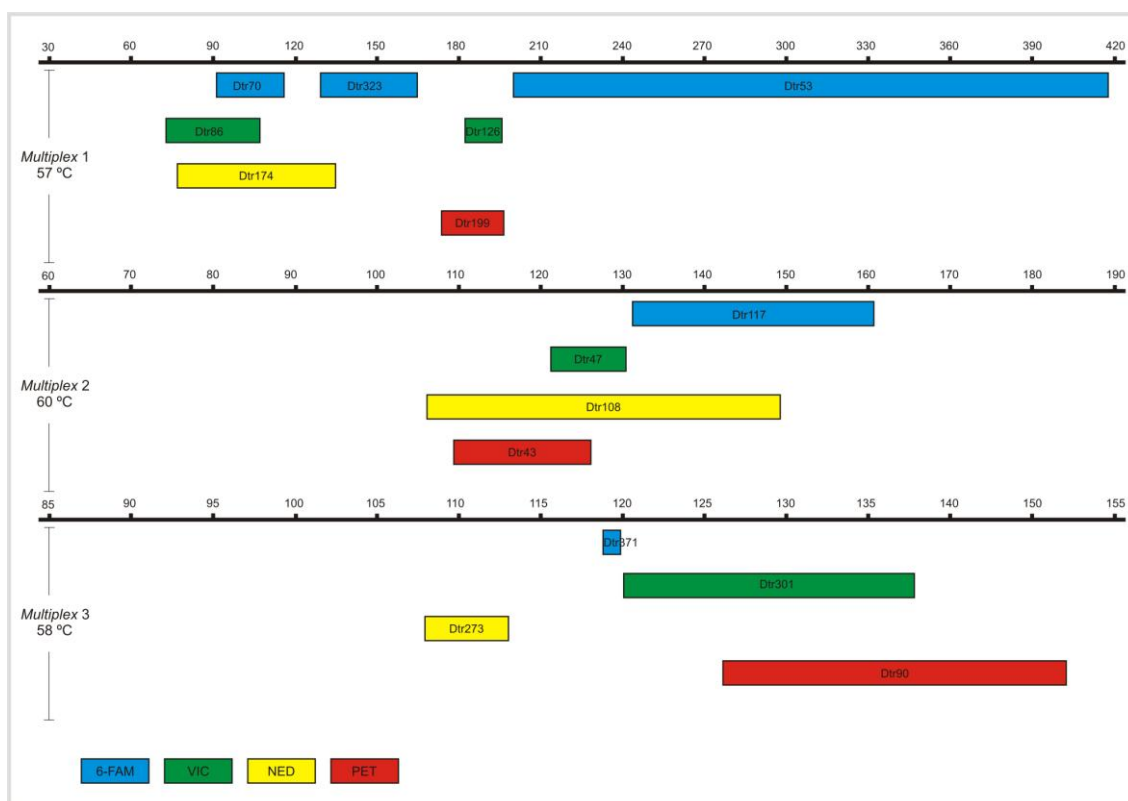


Figura 2.2. Distribución de los 15 *loci* microsatélite en tres PCRs *multiplex*. La longitud de las bandas es proporcional al rango de tamaño de los alelos

Una vez optimizada la concentración de los cebadores en cada una de las reacciones todos los *loci* amplificaron satisfactoriamente. Además, dado que se emplearon individuos previamente genotipados en las PCRs *monolocus*, se verificó que el tamaño de los diferentes alelos no varía al amplificar conjuntamente diferentes *loci*. En la Tabla 2.4 se detallan las características de cada una de las PCRs *multiplex* optimizadas, incluyendo los fluorocromos empleados y la concentración óptima de los cebadores para cada *locus*, así como, la temperatura de hibridación para cada una de las reacciones.

Tabla 2.4. Características de las PCRs *multiplex* optimizadas

<i>Multiplex</i>	<i>Locus</i>	Fluorocromo	Concentración	Temperatura (°C)
1	Dtr53	FAM	0,25	57
	Dtr70	FAM	0,20	
	Dtr86	VIC	0,30	
	Dtr126	VIC	0,25	
	Dtr174	NED	0,20	
	Dtr199	PET	0,15	
	Dtr323	FAM	0,20	
2	Dtr47	VIC	0,20	60
	Dtr117	FAM	0,20	
	Dtr43	PET	0,20	
	Dtr108	NED	0,10	
3	Dtr90	PET	0,20	58
	Dtr301	VIC	0,15	
	Dtr273	NED	0,10	
	Dtr371	FAM	0,15	

Los tres PCRs *multiplex* se amplificaron en un máximo de 50 individuos de la localidad de Vilarrube y las tasas de éxito fueron elevadas en los tres casos (81,14% *Multiplex* 1; 97,5% *Multiplex* 2; 98% *Multiplex* 3). Los valores de los índices de diversidad estimados fueron del orden de los obtenidos en las PCRs *monolocus* (Tabla 2.5). El número de alelos por *locus* varió entre 2 (Dtr371) y 15 (Dtr53). La heterocigosidad observada osciló entre 0,042 (Dtr371) y 0,811 (Dtr53) y la heterocigosidad esperada insesgada de Nei entre 0,041 (Dtr371) y 0,841 (Dtr117). Ninguno de los tests de desequilibrio de ligamiento realizados resultó significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni, por lo que puede considerarse que todos los *loci* segregan de forma independiente. Cuatro de los *loci* mostraron desviaciones significativas del equilibrio HW tras aplicar la corrección secuencial de Bonferroni y el programa MicroChecker sugirió la existencia de alelos nulos en estos cuatro *loci* (Dtr126, Dtr174, Dtr117 y Dtr108), con frecuencias que variaron entre 0,109 y 0,237.

Tabla 2.5. Características de los *loci* combinados en las PCRs *multiplex* (1, 2, 3) en individuos de Vilarrube

<i>Multiplex</i>	<i>Locus</i>	<i>N</i>	<i>Na</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>AN</i>
1	Dtr53	37	15	0,811	0,832	-
	Dtr70	45	6	0,644	0,749*	-
	Dtr86	34	10	0,618	0,835*	-
	Dtr126	38	5	0,316	0,622**	0,185
	Dtr174	40	9	0,225	0,612**	0,237
	Dtr199	44	5	0,318	0,322	-
	Dtr323	46	3	0,130	0,198	-
2	Dtr47	50	6	0,6	0,605	-
	Dtr117	49	14	0,633	0,841**	0,109
	Dtr43	47	10	0,660	0,783	-
	Dtr108	49	7	0,122	0,458**	0,228
3	Dtr90	49	9	0,796	0,740	-
	Dtr301	50	8	0,640	0,609	-
	Dtr273	49	3	0,225	0,241	-
	Dtr371	48	2	0,042	0,041	-

Na: número de alelos; *Ho*: heterocigosidad observada; *He*: heterocigosidad esperada insesgada de Nei; *AN*: frecuencia de alelos nulos; (*): significativo para $\alpha=0,05$; (**): significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni.

2.4. DISCUSIÓN

La coquina *D. trunculus* es un importante recurso en algunas áreas europeas debido a su elevado valor económico. Entre estas áreas se encuentran las rías gallegas que son ecosistemas con una elevada productividad biológica y constituyen hábitats ideales para el crecimiento y el cultivo de estos organismos. Sin embargo, los stocks salvajes de esta especie se encuentran en declive, por lo que es necesario evaluar el estado del recurso y desarrollar estrategias de gestión y conservación de la especie. Para ello, es preciso estudiar el fondo genético de las poblaciones. A pesar de ello, hasta el momento, no existen marcadores moleculares para la evaluación genético-poblacional de *D. trunculus*. En este trabajo se han desarrollado por primera vez marcadores microsatélite y se han optimizado tres PCRs *multiplex* que permiten la amplificación simultánea de varios *loci*. Además, se han obtenido estimas de variación genética en estos *loci* para la especie objeto de estudio.

Para aislar marcadores microsatélite se partió de la construcción de dos genotecas enriquecidas. La elección de los motivos microsatélite para el enriquecimiento se basó en las abundancias observadas en otros moluscos (genoteca I: ATC y CTGT), así como en experimentos *dot-blot* realizados en este trabajo para *D. trunculus* (genoteca I: GT; genoteca II: ACC y GATA). La genoteca I se enriqueció para tres motivos microsatélite, un dinucleótido (GT), un trinucleótido (ATC) y un tetranucleótido (CTGT). La forma reversa complementaria del motivo GT se ha detectado en la coquina *D. trunculus* en los experimentos *dot-blot* realizados en este trabajo. Tanto las repeticiones GT y ATC, permutaciones de las mismas o sus reversos complementarios, parecen ser también abundantes en otra especie del mismo género, *D. deltoides* (Miller y col., 2012). En esta especie estos motivos aparecen en seis (GT) y cuatro (ATC) microsatélites polimórficos del total de 20, aislados mediante secuenciación masiva. Además, el motivo ATC es frecuente en otras especies de moluscos, como el berberecho *Cerastoderma edule* (Martínez y col., 2009), la almeja babosa *Venerupis pullastra* (Pereira y col., 2010) o la almeja rubia *Venerupis rhomboides* (Chacón y col., 2013). El motivo tetranucleótido CTGT, común en *V. pullastra* (Pereira y col., 2010), se ha observado en 9 de los 19 marcadores microsatélites aislados en este trabajo para *D. trunculus*, tanto en su forma original (TGTC) como en su forma reversa complementaria (GACA) o como permutaciones de la misma (ACAG o AGAC). Por el contrario, los motivos ACC y GATA, utilizados en la genoteca II, no se observaron en ninguno de los microsatélites polimórficos identificados a pesar de que mostraron una elevada intensidad de hibridación en los

experimentos *dot-blot* realizados. Sin embargo, ambos motivos han sido detectados en los clones obtenidos a partir de la genoteca pero no ha sido posible su amplificación porque su posición en el extremo de la secuencia impidió el diseño de cebadores o bien se amplificaron pero resultaron monomórficos. Estos dos motivos son frecuentes en otros bivalvos como es el caso de *V. rhomboides* (Chacón y col., 2013). No obstante, tanto los motivos microsatélite como su abundancia relativa son variables incluso entre especies estrechamente relacionadas (Ross y col., 2003).

La redundancia, comúnmente observada cuando se realizan protocolos de enriquecimiento (Zane y col., 2002), fue moderada (15%). Este porcentaje de secuencias redundantes fue similar al obtenido en la zamburiña *Mimachlamys varia* (13%; Arias y col., 2011) e inferior a los descritos en los bivalvos *Atrina pectinata* (27%; Liu y col., 2009) y *Aequipecten opercularis* (40%; Arias y col., 2010). El número de *loci* microsatélite polimórficos observado con respecto al total de secuencias examinadas en *D. trunculus* fue más elevado (3,8%) que el obtenido en genotecas enriquecidas construidas para otros bivalvos, como es el caso de las ostras *Crassostrea virginica* (2,4%) (Reece y col., 2004) y *Pinctada maxima* (0,2%) (Evans y col., 2006), pero inferior al obtenido para el berberecho *C. edule* (12,2%) (Martínez y col., 2009) y para la volandeira *A. opercularis* (6,0%) (Arias y col., 2010). Estas diferencias en el rendimiento de las genotecas pueden estar relacionadas con diferentes factores, incluyendo la frecuencia de los microsatélites dentro del genoma de la especie estudiada y la estructura de los microsatélites y sus regiones flanqueantes (Néve y Megléc, 2000; Megléc y col., 2004; Cruz y col., 2005). Además, diferentes estudios han demostrado las dificultades existentes en el aislamiento de marcadores microsatélite para moluscos (Reece y col., 2004; McInerney y col., 2011).

En este trabajo, la construcción de las dos genotecas enriquecidas permitió aislar un total de 19 *loci* polimórficos en la coquina *D. trunculus*, que se clasificaron como puros (13), puros interrumpidos (4) y compuestos interrumpidos (2). En general, se espera que el nivel de polimorfismo sea mayor en los microsatélites puros que en los interrumpidos, ya que la existencia de nucleótidos que interrumpen la repetición reduce la posibilidad de apareamientos incorrectos, al tiempo que estabiliza las repeticiones (Schlötterer, 1998). Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio muestran que los microsatélites puros interrumpidos presentan un número medio de alelos (11,25) superior al de los microsatélites puros (6,15). Esta discrepancia podría relacionarse con la existencia de otros factores que afectan a la tasa de mutación de

los microsatélites, como son la composición nucleotídica de los motivos microsatélite y el número de repeticiones de los mismos. Schlöterer y Tautz (1992) han sugerido que microsatélites con una mayor proporción de adenina-timina en su composición nucleotídica mutarían a mayores tasas que las que presentan una elevada proporción de guanina-citosina. Sin embargo, en los microsatélites caracterizados en *D. trunculus* no se observa esta relación, dado que en cuatro de los *loci* (Dtr117, Dtr273, Dtr301 y Dtr323) que presentan mayor proporción de adenina-timina que de guanina-citosina en su secuencia el número de alelos es bajo (3 – 9). Además de la composición nucleotídica, Levinson y Gutman (1987) encontraron en procariotas evidencias de que los microsatélites con un número elevado de repeticiones presentaban una tasa de mutación más alta que los *loci* con un número de repeticiones menor. En nuestro caso, se ha observado que los *loci* con un menor número de repeticiones (3) de sus motivos microsatélite (Dtr174, Dtr273, Dtr323 y Dtr371) presentan un número bajo de alelos (2 – 3), a excepción de Dtr174 para el que se identificaron 10 alelos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el número de *loci* analizados en este trabajo limita el valor de estas observaciones.

El número de alelos varió entre dos para el *locus* Dtr371 y 17 para Dtr20. Estos valores están dentro del rango observado en marcadores microsatélite en otras especies de bivalvos, como *D. deltoides* (2 – 14) (Miller y col., 2012), *Cristaria plicata* (4 – 18) (Jia y col., 2010) y *M. varia* (4 - 16) (Arias y col., 2011). Sin embargo, fueron más bajos que los observados en *Crassostrea ariakensis* (2 - 36) (Xiao y col., 2008) y *A. opercularis* (9 – 86) (Arias y col., 2010). Los valores de heterocigosidad observada obtenidos en este trabajo (rango: 0,000 – 0,690) fueron ligeramente inferiores a los observados en *D. deltoides* (rango: 0,207 – 0,857) (Miller y col., 2012), mientras que en el caso de la heterocigosidad esperada los valores (rango: 0,078 – 0,950) fueron similares a los observados en la especie congénica (rango: 0,189 – 0,950) (Miller y col., 2012). Asimismo los valores de heterocigosidad obtenidos para *D. trunculus* resultaron similares a los observados en la almeja *V. pullastra* con este tipo de marcadores moleculares (*H_o*: 0,074 – 0,727 y *H_e*: 0,053 – 0,958) (Pereira y col., 2010).

Los *loci* que se desviaron del equilibrio HW tras la corrección secuencial de Bonferroni mostraron valores positivos del estadístico *F_{is}*, lo que indica un déficit de heterocigotos. Este fenómeno es común en poblaciones naturales de moluscos bivalvos y ha sido detectado empleando diferentes marcadores moleculares, como las alozimas (Zouros y Foltz, 1984; Borsa y col., 1991; Beaumont y Pether, 1996) o los

microsatélites (Launey y col., 2002; Arias-Pérez y col., 2012). Existen varios factores, tanto técnicos como biológicos, que podrían explicar el déficit de heterocigotos, entre los que se incluyen la endogamia, el efecto Wahlund, la selección y la presencia de alelos nulos (Zouros y Foltz, 1984). Dado que el programa MicroChecker estimó la presencia de alelos nulos en los nueve *loci* que se desviaron de lo esperado bajo equilibrio HW, en algunos casos con frecuencias superiores a 0,2, estos alelos son la causa más probable del déficit de heterocigotos detectado en nuestro estudio. Los alelos nulos están causados por mutaciones en los sitios de hibridación de los cebadores lo que impide la amplificación de los alelos afectados. De esta forma, se crean falsos homocigotos y los niveles estimados de homocigosidad aumentan. Los alelos nulos han sido detectados en diferentes grupos taxonómicos y en especies con tamaños efectivos altos, como es el caso de moluscos, que se caracterizan por presentar elevadas frecuencias de este tipo de alelos (Launey y col., 2002; Vadopalas y col., 2004; Chapuis y Estoup, 2007). Las frecuencias de alelos nulos obtenidas en este trabajo (0,109 – 0,277) son comparables a las estimadas en poblaciones naturales de otros moluscos bivalvos (Munguia-Vega y col., 2010; Sell y col., 2013).

El desarrollo de PCRs *multiplex* es un proceso complejo que requiere la optimización de diversos aspectos. Entre ellos, evitar la formación de dímeros entre cebadores, encontrar una temperatura de hibridación óptima para múltiples *loci* o seleccionar marcadores cuyo rango de tamaño alélico no solapen son los factores más destacados. Sin embargo, las PCRs *multiplex*, una vez optimizadas, facilitan los estudios poblacionales a gran escala ya que reducen el coste y el tiempo requerido para la amplificación y genotipado de las muestras en comparación con las PCRs *monolocus*. Con las PCRs *multiplex* se reduce la cantidad necesaria de ADN molde para la amplificación, así como, el número de muestras a manipular, disminuyendo por tanto el riesgo de errores. Además, los marcadores microsatélite son unos candidatos idóneos para ser coamplificados en PCRs *multiplex* debido a su pequeño tamaño. En los últimos años se han desarrollado en diferentes moluscos bivalvos, como en *D. deltoides* (Miller y col., 2012), y diferentes especies de almejas (Mura y col., 2012; Chacón y col., 2013; Borrell y col., 2014), ostras (Taris y col., 2005; Wang y col., 2010) y vieiras (Morvezen y col., 2013). En este trabajo, partiendo de 19 microsatélites, se optimizaron de forma exitosa tres PCRs *multiplex* con un total de 15 *loci*. Los cuatro *loci* (Dtr17, Dtr20, Dtr46 y Dtr285) no incluidos en las PCRs *multiplex* fueron descartados durante el proceso de optimización debido a que mostraron patrones trialélicos o excesivo *stuttering*. Las bandas *stutter* o tartamudas se originan durante la PCR debido a deslizamientos de cadena dando lugar a bandas con diferencias en el

número de unidades de repetición (Chapuis y Estoup, 2007). Este fenómeno complica la interpretación de los electroferogramas y, por tanto, el proceso de genotipado.

Las tasas de éxito en las PCRs *multiplex* fueron superiores en las *multiplex* con menor número de *loci* (*Multiplex* 2: 97,5%; *Multiplex* 3: 98%). Sin embargo, la *Multiplex* 1, que incluye casi el doble de *loci* microsatélite, también mostró un elevado porcentaje de éxito (81,14%). Estas diferencias pueden deberse a la competencia entre *loci* por la enzima y los nucleótidos presentes en la mezcla de reacción (Henegariu y col., 1997; Markoulatus y col., 2002). El número total de alelos de los *loci* incluidos en las *multiplex* se incrementó en la amplificación conjunta (112) respecto a la amplificación individual de los mismos (89). Del mismo modo, las heterocigosidades observada y esperada también aumentaron ligeramente en las *multiplex*, con rangos de 0,042 – 0,796 y 0,041 – 0,841, respectivamente. Cinco de los *loci* amplificados en las PCRs *multiplex* mostraron diferencias en los tests de bondad de ajuste al equilibrio HW con respecto a los valores observados en los análisis *monolocus*. Así, los *loci* Dtr108 y Dtr117 que se encontraban en equilibrio HW al ser amplificados de forma individual, mostraron desviaciones significativas del equilibrio HW tras la corrección secuencial de Bonferoni en el análisis de las PCRs *multiplex*. Por el contrario, tres *loci* (Dtr53, Dtr86 y Dtr273) que mostraban estas desviaciones en el análisis *monolocus*, se encontraron en equilibrio HW en la evaluación de las PCRs *multiplex*. El incremento del tamaño muestral podría contribuir al aumento del número de alelos así como de los valores de heterocigosidad observada y esperada. Además, un tamaño muestral mayor contribuye, en general, a un incremento en el poder estadístico lo que podría explicar, en parte, las diferencias observadas en el test de equilibrio HW.

En conclusión, en este estudio se han desarrollado y caracterizado los primeros marcadores microsatélite para la coquina *D. trunculus*. Estos 19 *loci* microsatélite identificados y las PCRs *multiplex* diseñadas constituyen una herramienta muy útil para la evaluación genética de poblaciones y el análisis de las relaciones genéticas entre los individuos, como la asignación de paternidades y las estimas de parentesco.

Diversidad genética y estructura poblacional de *Donax trunculus* en la Península Ibérica mediante marcadores microsatélite



3.1. INTRODUCCIÓN

España es el principal país productor de moluscos bivalvos de Europa, siendo Galicia una de las zonas productoras más importantes en términos extractivos. Una de las especies de moluscos bivalvos con mayor importancia en Galicia es la coquina *D. trunculus*. Desde un punto de vista económico, la coquina representa un recurso importante para el sector marisquero de esta comunidad. De hecho, en el año 2014 fue el bivalvo con mayor precio en las lonjas gallegas (Plataforma Tecnológica de Pesca de la Xunta de Galicia, <http://www.pescadegalicia.com>). Sin embargo, la extracción de la coquina *D. trunculus* en la comunidad gallega ha sufrido un gran descenso en los últimos años, de hecho desde el año 2001 al 2014 las capturas de este bivalvo han disminuido más de un 50% (Plataforma Tecnológica de Pesca de la Xunta de Galicia, <http://www.pescadegalicia.com>). Este declive en la producción podría estar relacionado con la intensa explotación a la que ha estado sometida esta especie. La explotación de la coquina, al igual que la de otros moluscos bivalvos, está regulada por el Plan General de Explotación Marisquera aprobado anualmente por la Consellería del Medio Rural y del Mar de la Xunta de Galicia. En este plan se recogen las normas y orientaciones destinadas a regular y programar la extracción de las diferentes especies. En él se incluyen las especies de interés, las áreas de explotación de cada una de ellas, el número máximo de días de extracción, el calendario de extracción, las cuotas máximas de captura y los puntos de control. Con el objetivo de lograr una explotación sostenible y mantener la productividad de las poblaciones naturales sometidas a explotación estos planes deberían incorporar consideraciones genéticas (Allendorf y col., 2008). En el caso de la coquina, los estudios genéticos son muy escasos a pesar de la importancia que esta especie representa para el sector marisquero gallego, tanto desde un punto de vista económico como ecológico. Los trabajos existentes se centran, principalmente, en análisis citogenéticos (Cornet y Soulard, 1990; Plohl y Cornudella, 1996, 1997; Satovic y Plohl, 2013), descripción del modo de herencia del ADNmt (Theologidis y col., 2008) e identificación de la especie (Espíñeira y col., 2009; Pereira y col., 2012). Desde un punto de vista poblacional no se han realizado evaluaciones de diversidad y estructura genética que permitan asesorar la gestión de las poblaciones de esta especie.

La intensa y prolongada mortalidad que conlleva la explotación de los recursos genera cambios genéticos en las poblaciones naturales (Allendorf y col., 2008). Estos cambios podrían estar relacionados con la selección que conlleva la explotación, puesto que esta suele ser dependiente de fenotipo (Law, 2007). Los individuos que poseen

características fenotípicas comercialmente más atractivas presentan mayor probabilidad de ser extraídos del medio natural. Así, si este fenotipo posee una base genética, se producirán cambios genéticos a nivel de la población natural (Allendorf y col., 2008). Los cambios genéticos originados pueden provocar un descenso en diferentes factores como la fecundidad, la viabilidad larvaria o la tasa de crecimiento larvaria, entre otros. Esto generaría consecuencias tanto a corto plazo, reduciendo la productividad de las poblaciones explotadas y la capacidad de recuperación de las sobreexplotadas, como a largo plazo, disminuyendo la aptitud de las subpoblaciones para evolucionar e incrementando el riesgo de extinción de la especie (Ryman y col., 1995; Olsen y col., 2004; Walsh y col., 2006). Puesto que es inevitable que exista un cierto nivel de cambio genético, como consecuencia de la selección ligada a la explotación, es importante el desarrollo de programas de gestión y recuperación que minimicen los efectos nocivos de la misma (Kuparinen y Merilä, 2007; Allendorf y col., 2008).

En el caso de las especies con poblaciones naturales sobreexplotadas, existe un mayor riesgo de cambio genético. La sobreexplotación conlleva un descenso en la densidad de los bancos naturales, lo que podría permitir un mayor efecto de la deriva genética (Frankham y col., 2002). Esto lleva a que sea más probable que alelos presentes en los progenitores no se transmitan a la descendencia y a que la pérdida de variación genética sea más rápida (Franklin, 1980; Kenchington, 2003). Además, las poblaciones pequeñas presentan una mayor tasa de endogamia, lo que podría ocasionar un descenso de la eficacia biológica (Frankham y col., 2002).

El descenso de la producción de coquina en los bancos naturales de la costa gallega plantea la necesidad de aplicar estrategias que contribuyan a incrementar la producción y que permitan la gestión sostenible del recurso. Entre ellas se incluyen la recuperación de zonas improductivas así como la repoblación de los bancos naturales con juveniles/adultos salvajes o con semilla producida en criadero. Con el objetivo de preservar la diversidad genética existente en las poblaciones del medio natural y minimizar los efectos genéticos adversos introducidos por las prácticas de criadero y repoblación, debe realizarse una evaluación genética del recurso.

En este capítulo se lleva a cabo un estudio con marcadores microsatélite en 17 muestras de *D. trunculus* recogidas a lo largo de la costa de la Península Ibérica, para obtener estimas de diversidad genética y estructura poblacional que contribuyan a

conocer las características genéticas de las diferentes áreas y sirvan para mejorar los programas de gestión y conservación del recurso.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1. Material de estudio y extracción de ADN

Los individuos de *D. trunculus* empleados en este estudio proceden de 17 localidades de la Península Ibérica distribuidas tanto en la costa Atlántica como en la Mediterránea. La Figura 3.1 muestra la situación geográfica de las localidades muestreadas.

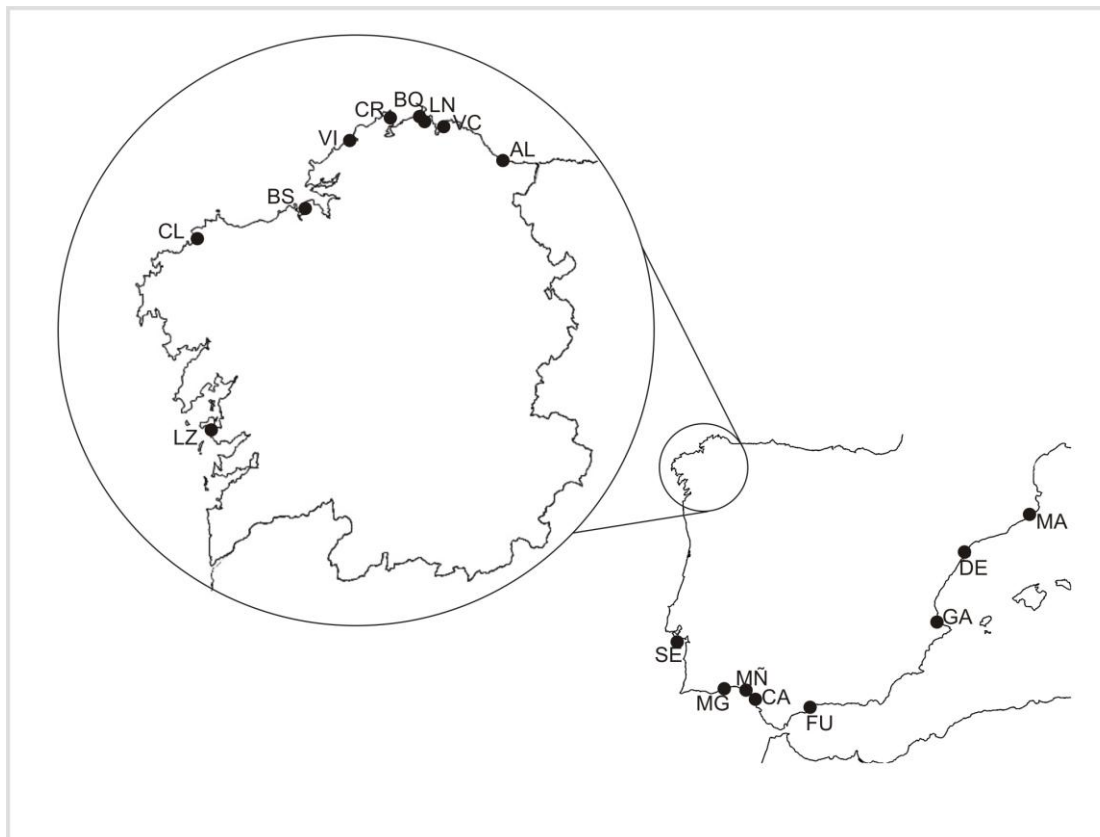


Figura 3.1. Situación de las localidades de muestreo: Altar (AL); O Vicedo (VC); Lombo das Navallas (LN); O Barqueiro (BQ); Cariño (CR); Vilarrube (VI); Bastiagueiro (BS); Corme – Laxe (CL); A Lanzada (LZ); Setúbal (SE); Monte Gordo (MG); Matalascañas (MÑ); Carboneras (CA); Fuengirola (FU); Gandía (GA); Delta del Ebro (DE); Maresme (MA)

Una vez en el laboratorio, los ejemplares se diseccionaron y se guardó de cada uno el pie y la masa visceral en etanol al 96% para su conservación. La extracción de ADN se llevó a cabo a partir de músculo empleando un método rápido y sencillo basado en el desarrollado por Walsh y col. (1991). La cuantificación del ADN extraído se realizó en un espectrofotómetro nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.).

3.2.2. Análisis de marcadores microsatélite

Los individuos analizados se genotiparon para los quince *loci* microsatélite polimórficos distribuidos en las tres PCRs *multiplex* optimizadas en el Capítulo 2. A partir de los genotipos identificados se llevaron a cabo los análisis de diversidad genética y diferenciación poblacional.

3.2.2.1. Diversidad genética

El número de alelos (N_a), la heterocigosidad observada (H_o) y la heterocigosidad esperada (H_e) insesgada de Nei (Nei, 1978) se calcularon usando el programa Genetix v.4.03 (Belkhir y col., 2004). Los valores de riqueza alélica (R_s) por *locus* y por combinación *locus* – localidad se obtuvieron con el programa Fstat v.2.9.3.2 (Goudet, 2001). También se analizó la existencia de diferencias significativas entre los valores de heterocigosidad y riqueza alélica de las diferentes muestras mediante un test de Friedman utilizando el paquete estadístico SPSS 16.0 (SPSS Inc).

Los tests para determinar la bondad de ajuste al equilibrio HW y a las condiciones de equilibrio de ligamiento se realizaron empleando el programa Genepop v.4.0 (Rousset, 2008). La significación se determinó mediante el método de cadena de Markov utilizando 10 000 *dememorizations*, 5000 *batches* y 5000 iteraciones por *batch*. Se calculó el coeficiente de endogamia (F_{is}) de Weir y Cockerham (1984) por *locus*, localidad y por combinación *locus* – localidad con el programa Genetix v.4.03. Utilizando el programa MicroChecker (Van Oosterhout y col., 2004) se estudió la presencia de alelos nulos y su frecuencia se estimó según el método de Brookfield 1 (Brookfield, 1996). Cuando se llevaron a cabo tests estadísticos múltiples, los valores de significación se ajustaron utilizando la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989).

La neutralidad de los marcadores microsatélite utilizados se evaluó con el test de homocigosidad de Ewens-Watterson (Watterson, 1978; Watterson, 1986) y el test exacto de Ewens-Watterson-Slatkin (Slatkin, 1994; Slatkin, 1996) implementados en el programa Arlequín v.3.11 (Excoffier y col., 2005).

3.2.2.2. Diferenciación poblacional

El grado de diferenciación poblacional se evaluó con el índice de fijación F_{st} de Weir y Cockherham (1984) por *locus*, por pares de localidades y global empleando el programa Genetix v.4.03. El nivel de significación de los valores F_{st} se determinó mediante un método no paramétrico basado en permutaciones (10 000 permutaciones) utilizando el mismo programa. Con el paquete estadístico SPSS 16.0 (SPSS Incl.) se representaron gráficamente los valores de F_{st} por pares de localidades mediante el método de escalamiento multidimensional no métrico (nMDS). A partir de los valores de F_{st} también se evaluó el flujo génico entre localidades estimando el número de migrantes por generación (N_m) entre pares de localidades con el programa GenAlEx (Peakall y Smouse, 2006) según:

$$N_m = \frac{\left(\frac{1}{F_{st}}\right) - 1}{4}$$

Asimismo se analizó la diferenciación génica entre pares de localidades mediante el programa Genepop v.4.0. El nivel de significación se determinó con un método de cadenas de Markov empleando 10 000 *dememorizations*, 5000 *batches* y 5000 iteraciones por *batch*. En caso de realizarse test estadísticos múltiples, los valores de significación se ajustaron mediante la corrección secuencial de Bonferroni.

Se estudiaron las relaciones filogenéticas entre muestras mediante un árbol construido a partir de una matriz de distancias empleando el paquete Phylip (Felsenstein, 1993). Se calculó la distancia de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) con el programa Gendist según:

$$D^2 = 4 \sum_m \left(1 - \sum_i p_{1mi}^{1/2} p_{2mi}^{1/2} \right) / \sum_m (a_m - 1)$$

Donde m es el número de *loci*, i es la suma de alelos del *locus* m , p_{1mi} es la frecuencia del alelo i en el *locus* m en la población 1, p_{2mi} es la frecuencia del alelo i en el *locus* m en la población 2 y a es el número de alelos del *locus* m .

El árbol se construyó empleando el algoritmo Neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987). La significación se obtuvo por análisis *bootstrap* (Felsenstein, 1985) con el programa Seqboot, empleándose 10 000 réplicas.

La estructura poblacional de las localidades también se evaluó con el programa Structure v.2.3.1 (Pritchard y col., 2000). Este programa determina el número de grupos genéticamente homogéneos (K) empleando una aproximación bayesiana. La probabilidad de los datos para valores de K determinados por el usuario se estima empleando métodos de cadena de Markov Monte Carlo. Las simulaciones se llevaron a cabo empleando un modelo sin ascendencia mixta y utilizando el origen de los individuos como información *a priori* y con frecuencias alélicas correlacionadas.

Con el programa Arlequín v.3.11 se realizó un análisis molecular de la varianza (AMOVA) *locus* por *locus* (10 000 permutaciones). El AMOVA permite estimar componentes de la varianza y estadísticos análogos a los estadísticos F , que reflejan la correlación de la diversidad genética a diferentes niveles de subdivisión jerárquica.

Por último, se analizó la correlación lineal entre la distancia genética medida como $F_{st}/(1-F_{st})$ (Rousset, 1997) y la distancia geográfica, en Km, a lo largo de la línea de costa entre pares de localidades mediante un test de Mantel con 10 000 aleatorizaciones utilizando el programa IBDWS v.3.23 (Jensen y col., 2005).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Diversidad genética

La diversidad genética de *D. trunculus* se analizó mediante las tres PCRs *multiplex* diseñadas en el Capítulo 2 en muestras de 48 – 50 individuos procedentes de 17 localidades de la Península Ibérica. Los ANEXOS A, B y C recogen los valores de los índices de diversidad estimados por localidad y *locus* incluido en las *Multiplex* 1, 2 y 3, respectivamente. Los 15 *loci* microsatélite resultaron polimórficos en todas las localidades estudiadas, con un número de alelos por *locus* que varió entre 5 (Dtr371) y 37 (Dtr53) (Tabla 3.1). Treinta y tres de los 226 alelos identificados fueron privados y su frecuencia fue en todos los casos inferior a 0,05. Once de los *loci* presentaron alelos privados en al menos una localidad y todas las localidades, excepto LZ, MG y VC, mostraron alelos privados en alguno de los *loci*. La heterocigosidad esperada por *locus* varió entre 0,082 (Dtr371) y 0,903 (Dtr53), y la observada entre 0,033 (Dtr371) y 0,758 (Dtr53), mientras que los valores de riqueza alélica media por *locus* y localidad oscilaron entre 1,807 (Dtr371) y 13,466 (Dtr53) (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Estimaciones de diversidad genética, rango de tamaño de los alelos y coeficiente de endogamia para cada *locus*

<i>Locus</i>	<i>Na</i>	<i>R</i>	<i>Rs</i>	<i>He</i>	<i>Ho</i>	<i>Fis</i>
Dtr43	13	105-126	7,351	0,780	0,562	0,279
Dtr47	9	121-134	4,171	0,620	0,570	0,080
Dtr53	37	191-427	13,466	0,903	0,758	0,161
Dtr70	8	92-116	5,298	0,746	0,685	0,081
Dtr86	21	67-124	7,854	0,818	0,687	0,161
Dtr90	14	94-152	6,811	0,710	0,677	0,047
Dtr108	11	107-149	3,756	0,283	0,135	0,522
Dtr117	26	123-173	9,349	0,846	0,474	0,441
Dtr126	21	166-275	7,222	0,789	0,383	0,514
Dtr174	12	78-188	6,244	0,650	0,303	0,534
Dtr199	17	152-238	4,121	0,383	0,338	0,118
Dtr273	7	103-116	3,177	0,321	0,209	0,350
Dtr301	16	114-141	6,098	0,670	0,471	0,297
Dtr323	9	129-179	3,245	0,257	0,221	0,139
Dtr371	5	104-127	1,807	0,082	0,033	0,605

Na: número de alelos; *R*: rango de tamaño de los alelos en pares de bases; *Rs*: riqueza alélica media por localidad basada en un tamaño muestral mínimo de 16 individuos; *He*: heterocigosidad esperada insesgada de Nei; *Ho*: heterocigosidad observada; *Fis*: coeficiente de endogamia

Los índices de diversidad genética por localidad (Tabla 3.2) resultaron similares en todas las localidades estudiadas y el test de Friedman no mostró diferencias significativas entre localidades para ninguno de los tres parámetros de diversidad analizados (R_s , H_e y H_o). Los valores medios de heterocigosidad esperada oscilaron entre 0,544 (VC) y 0,606 (CL y MA) y los de heterocigosidad observada entre 0,411 (DE) y 0,601 (CA). Todas las localidades mostraron un valor de heterocigosidad observada inferior al de la esperada, excepto CA. La riqueza alélica media osciló entre 5,557 (VC) y 6,527 (MA).

Tabla 3.2. Diversidad genética en 17 localidades de *D. trunculus* en la Península Ibérica

Localidad	<i>N</i>	<i>N_a</i>	<i>R_s</i>	<i>H_e</i>	<i>H_o</i>	<i>F_{is}</i>
AL	50	131 (1)	6,189	0,576	0,487	0,194
VC	50	115	5,557	0,544	0,486	0,303
LN	50	119 (1)	5,799	0,572	0,531	0,200
BQ	50	115 (2)	5,753	0,584	0,451	0,300
CR	50	126 (1)	6,045	0,576	0,471	0,274
VI	50	115 (1)	5,652	0,567	0,476	0,193
BS	50	114 (2)	5,737	0,561	0,420	0,202
CL	50	124 (1)	6,068	0,606	0,479	0,265
LZ	50	133	6,231	0,585	0,578	0,236
SE	48	119 (4)	6,069	0,579	0,521	0,201
MG	50	124	6,014	0,583	0,581	0,217
MÑ	50	122 (1)	5,969	0,578	0,442	0,238
CA	49	112 (2)	5,954	0,581	0,601	0,171
FU	50	122 (3)	5,943	0,603	0,581	0,297
GA	50	123 (3)	6,213	0,603	0,480	0,341
DE	50	124 (5)	6,247	0,589	0,411	0,353
MA	50	133 (5)	6,527	0,606	0,446	0,383

N: número de individuos; *N_a*: número de alelos (alelos privados); *R_s*: riqueza alélica basada en un tamaño muestral mínimo de 16 individuos; *H_e*: heterocigosidad esperada insesgada promedio de Nei; *H_o*: heterocigosidad observada promedio; *F_{is}*: coeficiente de endogamia

Ninguno de los tests de desequilibrio de ligamiento realizados para todos los pares de *loci* en cada una de las localidades resultó significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni, por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula de que los *loci* analizados segregan de forma independiente. Ciento ochenta y seis de las 255 combinaciones *locus*-localidad no mostraron desviaciones del equilibrio HW tras la corrección secuencial de Bonferroni (ANEXOS A, B y C) y cuatro *loci* (Dtr47, Dtr70, Dtr90 y Dtr323) no se alejaron del equilibrio HW en ninguna localidad. De las 69 combinaciones en desequilibrio, 39 se concentraron en tres *loci*, Dtr117, Dtr126 y

Dtr174. Todas las combinaciones que no se ajustaron al equilibrio presentaron valores F_{is} positivos, indicando la existencia de un déficit de heterocigotos.

El test de homocigosidad de Ewens-Watterson y el test exacto de Ewens-Watterson-Slatkin detectaron la existencia de desviaciones de la neutralidad en el *locus* Dtr174 para la localidad MA. Además, el test exacto detectó desviaciones significativas en el *locus* Dtr174 para la localidad DE y en el *locus* Dtr117 para la localidad VC.

El programa MicroChecker sugirió la presencia de alelos nulos en las 69 combinaciones *locus*-localidad que no se encontraron en equilibrio HW (Tabla 3.3). Tres *loci*, Dtr117, Dtr126 y Dtr174, mostraron una frecuencia estimada de alelos nulos superior a 0,2 en al menos siete de las localidades.

Tabla 3.3. Frecuencias estimadas de alelos nulos en las combinaciones *locus*-localidad que no se encontraron en equilibrio HW

	Dtr43	Dtr573	Dtr86	Dtr108	Dtr117	Dtr126	Dtr174	Dtr199	Dtr273	Dtr301	Dtr371
AL	-	-	-	-	0,124	0,262	-	-	-	-	-
VC	0,157	-	-	-	0,295	0,280	0,195	-	-	-	-
LN	-	-	-	0,125	0,147	-	0,186	-	-	-	-
BQ	0,165	-	0,108	-	0,221	0,318	0,204	-	-	-	0,101
CR	-	-	-	-	0,222	0,232	0,189	-	-	0,138	0,118
VI	-	-	-	0,228	-	0,185	0,219	-	-	-	-
BS	-	-	-	-	0,196	0,202	0,164	-	-	-	-
CL	-	-	-	0,171	0,160	0,235	0,211	-	-	-	-
LZ	-	-	-	0,129	-	0,275	-	-	-	0,183	-
SE	-	-	-	-	-	0,222	-	-	-	0,250	0,105
MG	0,181	-	-	0,129	0,220	0,227	-	-	-	-	-
MÑ	0,190	-	-	0,104	0,253	0,176	0,147	-	-	-	-
CA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,098	-
FU	-	-	-	0,121	0,225	-	0,308	0,155	-	0,156	-
GA	-	0,117	0,185	-	0,303	0,213	0,384	-	-	-	-
DE	0,176	-	0,157	-	0,174	0,227	0,343	-	0,219	0,139	-
MA	-	-	-	0,143	0,264	0,242	0,460	-	0,284	0,200	-

3.3.2. Estructura poblacional

El análisis de la diferenciación poblacional se realizó con 12 de los 15 *loci* microsatélite incluidos en las PCRs *multiplex*. Dado que la presencia de alelos nulos en elevada frecuencia, mayor que 0,2, puede conducir a sobreestimar tanto los valores F_{st} como

las distancias genéticas (Chapuis y Estoup, 2007), los análisis de diferenciación poblacional se realizaron sin los *loci* Dtr117, Dtr126 y Dtr174.

El valor global del estadístico F_{st} con los 12 *loci* fue 0,015, significativamente distinto de cero ($P < 0,001$). El valor F_{st} por *locus* varió entre -0,001 (Dtr86) y 0,077 (Dtr199), resultando siete de ellos significativos para un $\alpha = 0,05$ (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Valores F_{st} por *locus* y global

<i>Locus</i>	F_{st}	P -valor
Dtr43	0,005	0,030*
Dtr47	0,035	<0,001*
Dtr53	0,020	<0,001*
Dtr70	0,004	0,055
Dtr86	-0,001	0,673
Dtr90	0,004	0,030*
Dtr108	0,004	0,132
Dtr199	0,077	<0,001*
Dtr273	0,032	<0,001*
Dtr301	0,007	0,020*
Dtr323	0,004	0,117
Dtr371	0,003	0,234
Global	0,015	<0,001*

(*) significativo para un $\alpha = 0,05$

La Tabla 3.5 muestra los valores F_{st} por pares de localidades. De los 136 tests F_{st} realizados entre pares de localidades, 51 resultaron significativos tras la corrección secuencial de Bonferroni. Estos contrastes incluyen a la localidad FU, que resultó significativamente distinta a todas las demás, así como a las localidades GA, DE y MA. En las localidades DE y MA se observaron valores F_{st} significativos respecto a todas las localidades, excepto entre ellas y con GA. El análisis de las distribuciones de las frecuencias génicas por pares de localidades para cada *locus*, resultó significativo, tras la corrección secuencial de Bonferroni, en 86 de las 1632 combinaciones realizadas, 84 de las cuales se centraron en cinco *loci* (Dtr47, Dtr53, Dtr199, Dtr273 y Dtr301). De las combinaciones significativas, 78 implicaron a las localidades DE, GA, MA y FU, en consonancia con los análisis F_{st} por pares.

Tabla 3.5. Valores F_{st} por pares de localidades (sobre la diagonal) y P -valores correspondientes (bajo la diagonal)

	AL	VC	LN	BQ	CR	VI	BS	CL	LZ	SE	MG	MÑ	CA	FU	GA	DE	MA
AL		-0,001	0,000	-0,001	-0,003	-0,004	0,002	-0,004	-0,003	0,005	-0,003	0,000	0,004	0,052**	0,016**	0,028**	0,032**
VC	0,535		0,002	0,004	-0,002	0,000	0,004	0,004	0,001	0,009*	0,005	0,004	0,011*	0,059**	0,024**	0,029**	0,038**
LN	0,503	0,224		0,002	0,001	0,001	0,001	-0,004	0,003	0,002	0,004	0,004	0,009*	0,036**	0,012*	0,028**	0,033**
BQ	0,655	0,104	0,227		0,002	0,000	0,006*	-0,002	0,002	0,003	0,003	-0,001	0,001	0,048**	0,022**	0,031**	0,032**
CR	0,871	0,694	0,351	0,270		0,000	0,000	-0,001	-0,002	0,004	0,001	-0,001	0,005	0,055**	0,020**	0,025**	0,032**
VI	0,920	0,471	0,372	0,444	0,477		0,003	-0,004	0,001	0,008*	0,004	0,003	0,005	0,052**	0,018**	0,031**	0,034**
BS	0,213	0,096	0,345	0,033	0,447	0,185		-0,001	0,001	0,006*	0,005	0,004	0,009*	0,047**	0,012**	0,019**	0,023**
CL	0,912	0,137	0,888	0,654	0,652	0,917	0,589		-0,001	0,001	-0,002	-0,004	0,002	0,045**	0,010*	0,023**	0,025**
LZ	0,808	0,301	0,151	0,269	0,708	0,368	0,275	0,659		0,008*	0,001	0,003	0,010*	0,053**	0,012*	0,022**	0,027**
SE	0,071	0,020	0,233	0,155	0,128	0,016	0,038	0,328	0,018		0,008*	0,000	-0,006	0,049**	0,026**	0,039**	0,042**
MG	0,846	0,077	0,107	0,187	0,330	0,091	0,073	0,736	0,393	0,021		0,000	0,009*	0,048**	0,012*	0,022**	0,025**
MÑ	0,456	0,104	0,118	0,622	0,609	0,194	0,086	0,932	0,150	0,421	0,504		-0,001	0,050**	0,016**	0,023**	0,022**
CA	0,093	0,006	0,016	0,338	0,076	0,077	0,012	0,283	0,003	0,983	0,008	0,551		0,056**	0,028**	0,039**	0,037**
FU	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		0,042**	0,066**	0,069**
GA	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	0,003	0,002	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001		0,005	0,008*
DE	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,072		-0,001
MA	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,016	0,511	

(*) significativo para un $\alpha = 0,05$; (**) significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni

En el análisis nMDS se observa que la localidad FU aparece separada del resto de localidades (Figura 3.2). Las demás localidades se distribuyen en dos grupos, uno que incluye a las localidades GA, DE y MA, y otro que incluye a las localidades restantes. El bajo nivel del valor de la fórmula de estrés 1 obtenido en este análisis (0,093) indica que el escalamiento multidimensional constituye una buena representación de los datos, siguiendo las directrices descritas por Kruskal (1964).

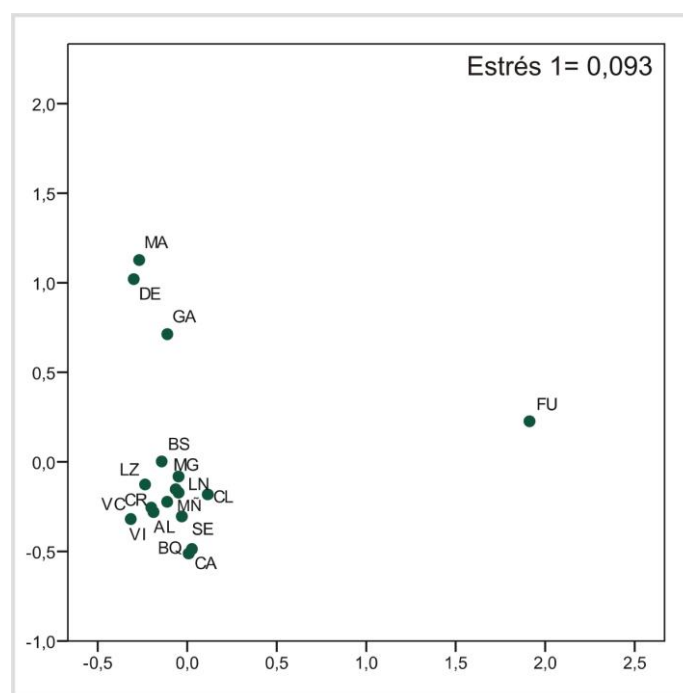


Figura 3.2. Representación del nMDS realizado sobre la matriz de valores F_{st} entre pares de localidades

Las estimas de Nm presentaron los valores más elevados en las comparaciones entre las localidades situadas en el Océano Atlántico (AL, VC, LN, BQ, CR, VI, BS, CL, LZ, SE, MG, MÑ y CA) así como, entre las localidades GA, DE y MA, situadas en el Mar Mediterráneo. Los valores más bajos se observaron en las comparaciones que incluían a la localidad FU (Tabla 3.6).

La reconstrucción de las relaciones filogenéticas mediante el algoritmo *Neighbor-Joining* y la distancia de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) entre las diecisiete localidades incluidas en este trabajo se muestra en la Figura 3.3. En el árbol construido las localidades se agruparon acorde a su situación geográfica, con una separación clara entre las localidades situadas en la costa Atlántica y las localizadas en el Mediterráneo. Esta segregación está apoyada por un valor de *bootstrap* elevado (87%). Más detalladamente, se observa que las localidades situadas en el noroeste de

la Península Ibérica (AL, VC, LN, BQ, CR, VI, BS, CL y LZ) están estrechamente relacionadas y filogenéticamente próximas al resto de localidades situadas en el Océano Atlántico (SE, MG, MÑ y CA). En el otro extremo del árbol se sitúan las localidades del este de la península (GA, DE y MA). La localidad FU es la localidad filogenéticamente más distante, ocupando un lugar intermedio entre ambos grupos.

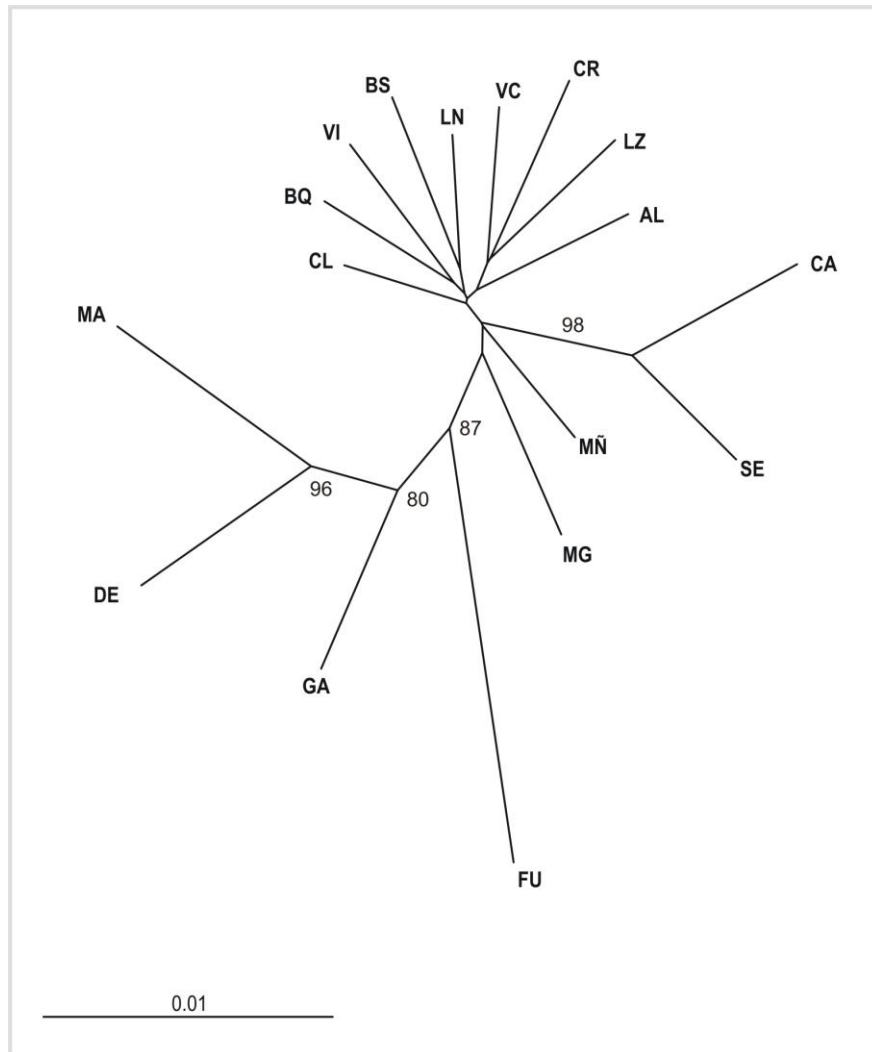


Figura 3.3. Árbol *Neighbour-joining* para las 17 localidades de *D. trunculus* basado en la distancia Cavalli-Sforza y Edwards (1967) calculada a partir de las frecuencias alélicas de 12 *loci* microsatélite. Los números de los nodos indican los valores *bootstrap* (10 000 réplicas). Los valores *bootstrap* inferiores al 50% no se muestran

Tabla 3.6. Estimaciones de Nm entre pares de localidades

[illegible]

El programa Structure indicó la existencia de tres *clústers* distintos. El valor máximo de máxima verosimilitud [$\text{LnPr}(X|K)$] se obtuvo para $K=4$, aunque el valor para $K=3$ fue muy similar (Figura 3.4). La distribución del valor ΔK mostró un pico máximo para $K=3$ y su valor resultó muy próximo al estimado para $K=4$.

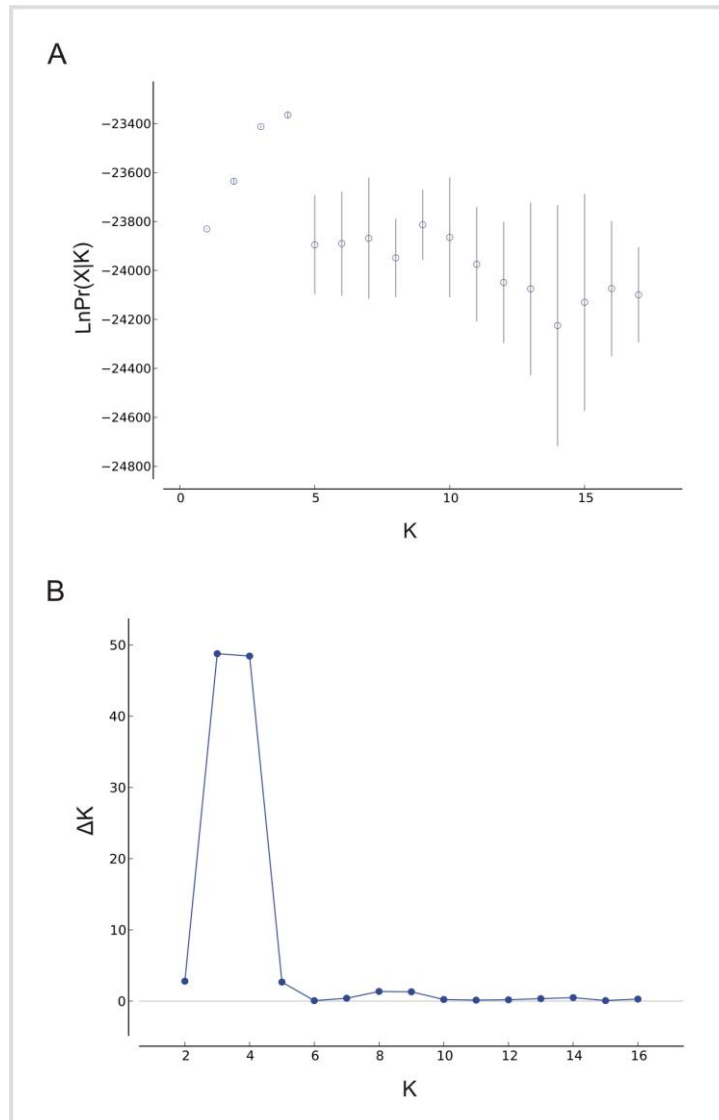


Figura 3.4. Distribución de la verosimilitud estimada de K (A) y ΔK (B). En el gráfico de verosimilitud (A) se representa la media del Ln de la probabilidad estimada de los datos para cada valor de K [$\text{LnPr}(X|K)$] empleando 20 réplicas. En el gráfico de ΔK (B) no están representados los valores de $K=1$ y $K=17$ al calcularse ΔK como la diferencia entre valores consecutivos de K

La Figura 3.5 representa el resultado obtenido al considerar la existencia de dos (Figura 3.5.A), tres (Figura 3.5.B) y cuatro (Figura 3.5.C) *clústers*. En el análisis bayesiano para $K=2$ (Figura 3.5.A), los individuos de las localidades situadas en la

costa Atlántica (AL, VC, LN, BQ, CR, VI, BS, CL, LZ, SE, MG, MÑ y CA) fueron asignados a un grupo y los pertenecientes a las de la costa Mediterránea a otro (FU, GA, DE y MA). En el caso del análisis para $K=3$ (Figura 3.5.B), el grupo con las localidades del Mediterráneo se dividió en dos, uno formado por la localidad FU y otro con las restantes. Además, algunos individuos de las localidades SE y CA presentan una probabilidad elevada de proceder del *clúster* mayoritario en FU. Para $K=4$ (Figura 3.5.C) se diferencian los tres *clústers* descritos previamente, uno compuesto por las localidades del Atlántico, otro por FU y otro por las restantes localidades del Mediterráneo, mientras que algunos individuos de SE y CA presentan una alta probabilidad de proceder de un cuarto *clúster*.

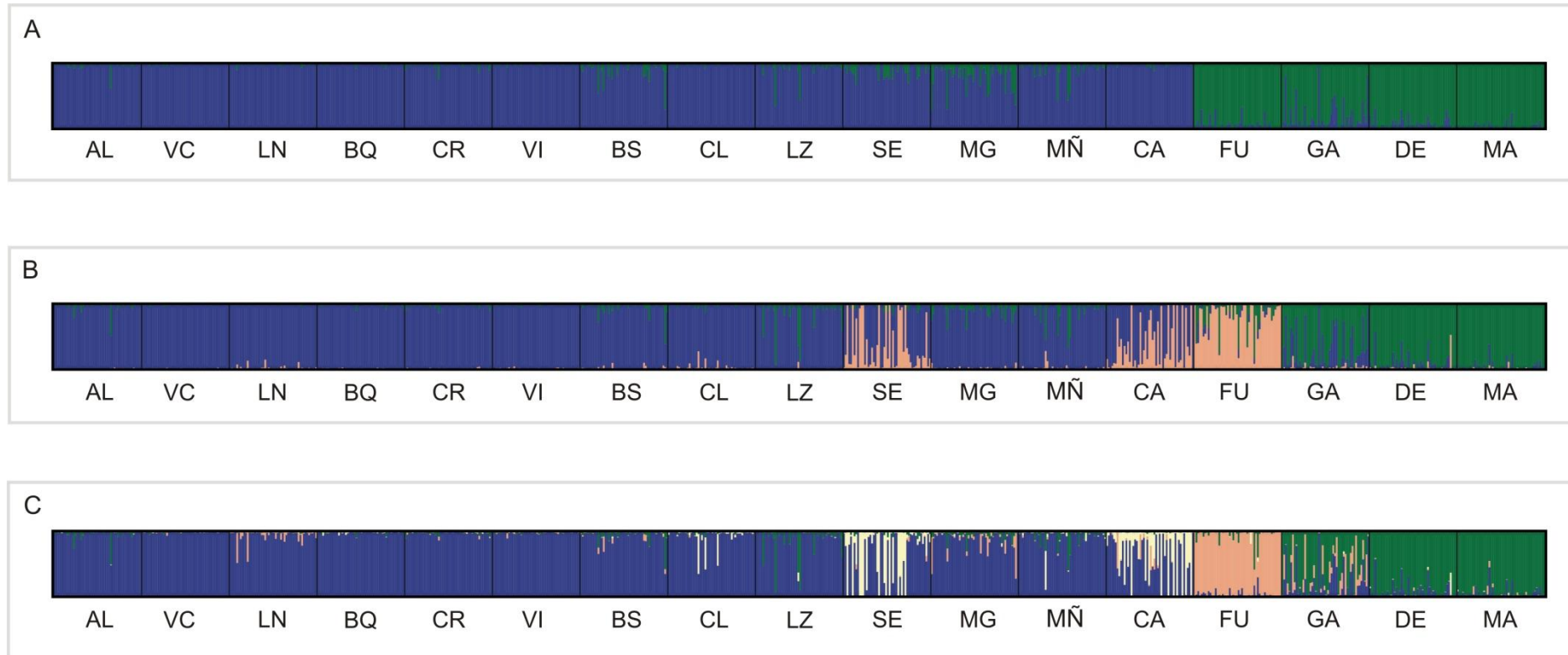


Figura 3.5. Análisis bayesiano de agrupación basado en marcadores microsatélite considerando $K=2$ (A), $K=3$ (B) y $K=4$ (C). Cada color representa un grupo. Cada individuo se representa como una barra vertical dividida en segmentos con colores que corresponden al coeficiente estimado de pertenencia a cada uno de los K grupos

Teniendo en cuenta los valores F_{st} entre pares de localidades así como los resultados del análisis nMDS y del programa Structure, se realizó un análisis AMOVA con los tres grupos mencionados previamente. El AMOVA realizado mostró que un porcentaje pequeño (0,14%) pero significativo de la variación se debe a diferencias entre los tres grupos identificados, mientras que la mayor parte de la misma (99,84%) corresponde a las diferencias entre individuos (Tabla 3.7). El porcentaje de variación entre localidades dentro de los grupos fue muy bajo (0,02%) y no resultó significativo. Además, tras los resultados observados en el análisis bayesiano y dado que en el análisis F_{st} por pares la localidad FU sale distinta a todas las localidades, se realizaron dos análisis AMOVA con dos grupos (Atlántico y Mediterráneo) e incluyendo a la localidad FU en uno de ellos. El AMOVA con FU incluida dentro del grupo Mediterráneo mostró un porcentaje de variación entre grupos (0,10%) inferior al observado al realizar el análisis con los tres grupos aunque significativo. El porcentaje de variación entre poblaciones dentro de grupos se duplicó respecto al observado con tres grupos (0,04%) pero no resultó significativo. Al realizar el AMOVA con FU incluida dentro del grupo Atlántico se observó un porcentaje de variación entre grupos más bajo (0,04%) que en los dos casos anteriores y no significativo. Respecto al porcentaje de variación entre poblaciones dentro de los grupos este fue superior (0,07%) y significativo.

Tabla 3.7. AMOVA considerando a) tres grupos: Atlántico, Mediterráneo y FU, b) dos grupos: Atlántico incluyendo FU y Mediterráneo y c) dos grupos: Atlántico y Mediterráneo incluyendo FU

<i>Fuente de variación</i>	<i>Porcentaje de variación</i>	<i>Índice de fijación</i>
(a) Atlántico – Mediterráneo – FU		
Entre grupos	0,14	$F_{ct}=0,00024^*$
Entre poblaciones dentro de los grupos	0,02	$F_{sc}=0,00161$
Dentro de las poblaciones	99,84	$F_{st}=0,00137^*$
(b) Atlántico – Mediterráneo con FU		
Entre grupos	0,10	$F_{ct}=0,00100^*$
Entre poblaciones dentro de los grupos	0,04	$F_{sc}=0,00041$
Dentro de las poblaciones	99,86	$F_{st}=0,00141^*$
(c) Atlántico con FU – Mediterráneo		
Entre grupos	0,04	$F_{ct}=0,00038$
Entre poblaciones dentro de los grupos	0,07	$F_{sc}=0,00067^*$
Dentro de las poblaciones	99,89	$F_{st}=0,00106^*$

(*) significativo para un $\alpha=0,05$

En la Figura 3.6 se representan los tests de Mantel realizados con todas las localidades y al incluir sólo las del Atlántico. En los dos casos se observó una correlación significativa entre la distancia genética y la geográfica, lo que sugiere la existencia de procesos de aislamiento por distancia en las localidades estudiadas. Sin embargo, el ajuste de los valores a la recta de regresión es reducido, de forma que la variación explicada por la recta de regresión es baja. Este test no se realizó para las localidades del Mediterráneo debido al bajo número de localidades disponibles.

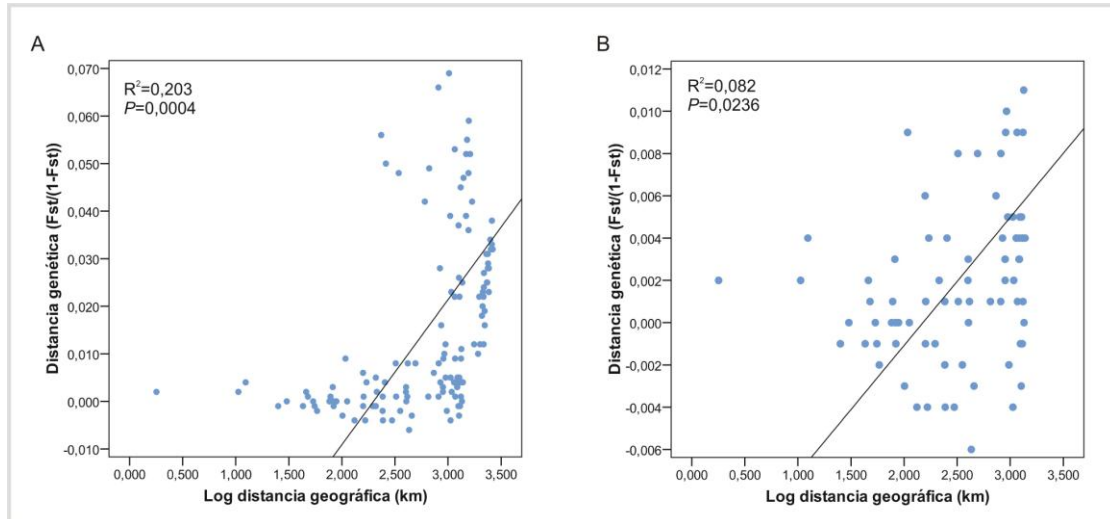


Figura 3.6. Relación entre la distancia genética entre pares de localidades y la distancia geográfica al considerar todas las localidades (A) y al considerar únicamente las situadas en la costa del océano Atlántico (B)

3.4. DISCUSIÓN

Este trabajo representa el primer estudio genético – poblacional de la coquina *D. trunculus* en la Península Ibérica. En él se aportan estimas de diversidad genética y diferenciación poblacional de un total de diecisiete localidades empleando marcadores microsatélite. A pesar de la importancia que presenta esta especie desde un punto de vista económico, la variación y diferenciación genética de la coquina no se ha evaluado previamente en esta región. Los datos obtenidos podrían contribuir a la conservación y recuperación de los bancos sobreexplotados.

Los 15 *loci* microsatélite analizados resultaron polimórficos en todas las localidades examinadas, con un número de alelos que varió entre 5 (Dtr371) y 37 (Dtr53). La heterocigosidad observada y esperada por *locus* osciló entre 0,033 (Dtr371) y 0,758 (Dtr53) y entre 0,082 (Dtr371) y 0,903 (Dtr53), siendo los valores globales 0,434 y 0,591, respectivamente. Respecto a las localidades, estas mostraron niveles de diversidad genética similares, independientemente del parámetro estudiado (número de alelos, riqueza alélica y heterocigosidad esperada y observada). El test de Friedman para los valores de riqueza alélica y heterocigosidad esperada y observada de las localidades no detectó diferencias significativas en ninguno de los casos. Los valores globales de heterocigosidad esperada (0,544 – 0,606) y riqueza alélica (5,557 – 6,527) observados para *D. trunculus* resultaron inferiores a las estimas proporcionadas por microsatélites en un estudio con el mejillón *Mytilus galloprovincialis* en la misma región geográfica ($He=0,939 - 0,948$; $Rs=23,781 - 28,916$) (Diz y Presa, 2008). Sin embargo, las estimas obtenidas en este trabajo fueron similares a las observadas en la almeja babosa *Venerupis pullastra* en un estudio con microsatélites en localidades de la costa Atlántica de la Península Ibérica ($He=0,566 - 0,609$; $Rs=5,488 - 6,207$) (Pereira, 2013).

Todas las localidades mostraron desviaciones del equilibrio HW para alguno de los quince *loci* estudiados. Cuatro de los marcadores (Dtr47, Dtr70, Dtr90 y Dtr323) no mostraron desviaciones del equilibrio HW en ninguna localidad, mientras que más de la mitad de las combinaciones *locus* – localidad en desequilibrio se concentraron en tres *loci* (Dtr117, Dtr126 y Dtr174). Todas las combinaciones que se desviaron del equilibrio HW mostraron valores positivos del estadístico F_{is} , lo que indica la existencia de un déficit de heterocigotos. Este déficit es habitual en bivalvos y ha sido detectado empleando marcadores microsatélite en diferentes especies, como ostras (Launey y col., 2002; Hedgecock y col., 2004), mejillones (Astaneu y col., 2005), longueirón

(Arias-Pérez y col., 2012) o berberecho (Martínez y col., 2015), entre otros. Existen varios factores tanto biológicos como técnicos, incluyendo efecto Wahlund, endogamia, selección y alelos nulos, que pueden explicar la existencia de este déficit.

El efecto Wahlund consiste en una reducción de la heterocigosidad como consecuencia de una subdivisión poblacional, temporal o espacial. Cuando una muestra incluye individuos de dos o más poblaciones que difieren en las frecuencias alélicas de un *locus*, la heterocigosidad observada es menor que la esperada bajo equilibrio HW. En ocasiones, cohortes larvarias de diferente procedencia se asientan en un mismo lugar de muestreo contribuyendo a la aparición de este fenómeno (Astaneí y col., 2005). En este estudio, todas las localidades mostraron déficit de heterocigotos en algunos de los *loci* analizados. Sin embargo, los valores F_{st} por pares no mostraron evidencias de diferenciación genética para todas las localidades, por lo que resulta poco probable que exista estructuración genética en cada localidad y, por tanto, que el efecto Wahlund sea una causa relevante en el déficit de heterocigotos observado.

Otro factor que puede contribuir al déficit de heterocigotos es la endogamia. Sin embargo, dada la fertilización externa y la extensa dispersión larvaria que presentan la mayoría de los bivalvos, es improbable que este factor sea el principal causante del déficit de heterocigotos observado. Además, la endogamia debería afectar a todos los *loci* por igual, generando una deficiencia de heterocigotos uniforme entre *loci* (Gaffney y col., 1990; Astaneí y col., 2005). En este trabajo, los valores positivos de F_{is} obtenidos se distribuyeron de forma heterogénea entre los *loci*.

La selección es otra de las causas que originan un déficit de heterocigotos. Aunque en general se considera que los microsatélites son marcadores neutros, algunos pueden encontrarse bajo el efecto de la selección, bien de forma directa o indirecta (Li y col., 2002). En este estudio se detectaron desviaciones significativas de la neutralidad para los *loci* Dtr117 y Dtr174. Sin embargo, estas desviaciones sólo fueron significativas para una localidad de las 13 que se desviaron de lo esperado bajo equilibrio HW en el caso del *locus* Dtr117, y en dos localidades de las 12 en desequilibrio para el *locus* Dtr174. Aunque los valores de estos tests indican la posibilidad de que ambos *loci* estén sometidos a selección equilibradora, ésta sólo explicaría parte del déficit observado para estos *loci*. Por tanto, la selección no parece ser la principal causa del déficit de heterocigotos observado en este trabajo.

La presencia de alelos nulos es otra posible causa del déficit de heterocigotos observado, ya que los individuos heterocigotos con alelos nulos son genotipados como homocigotos, provocando la detección de una falsa deficiencia de heterocigotos en la población. En este estudio, en los tres *loci* que se desviaron de lo esperado bajo equilibrio HW en 12 o más localidades (Dtr117, Dtr126 y Dtr174) se estimaron frecuencias de alelos nulos superiores a 0,2 en la mayor parte de los casos. Los alelos nulos son frecuentes en muchos grupos taxonómicos (Dakin y Avise, 2004) pero parecen ser particularmente comunes en poblaciones con tamaños efectivos de población elevados (Chapuis y Estoup, 2007), como es el caso de los moluscos. Así, al igual que sucede en otros bivalvos, donde el déficit de heterocigotos ha sido atribuido a la presencia de alelos nulos, presentes hasta en el 50% de los *loci*, (Launey y col., 2002; Li y col., 2003; Astanei y col., 2005; Galindo-Sánchez y col., 2008; Gardeström y col., 2008; Qiu y col., 2014), este tipo de alelos puede ser la principal causa del déficit de heterocigotos observado en este trabajo.

Los análisis realizados en este estudio, incluyendo estimas de F_{st} global y por pares de localidades, análisis bayesiano, cálculo del número de migrantes, reconstrucción de las relaciones filogenéticas de las localidades y AMOVA, sugieren la existencia de diferenciación genética entre las localidades de la Península Ibérica. El valor global del estadístico F_{st} (0,015) indicó la existencia de estructura genética significativa ($P < 0,001$). El análisis de los valores F_{st} entre pares de localidades reveló que la diferenciación está determinada por cuatro localidades (FU, GA, DE y MA). FU fue la única localidad que mostró diferencias significativas respecto a todas las localidades del estudio, mientras que GA lo hizo respecto a diez de las mismas. En el caso de DE y MA, estas presentaron diferenciación significativa con todas las localidades excepto entre ellas y con GA. Esta distribución de valores F_{st} es evidente en la representación del escalamiento multidimensional, donde se observa a FU separada de todas las localidades, un grupo formado por las localidades GA, DE y MA, situados en la costa Mediterránea y otro grupo que incluye a las restantes localidades, todas situadas en la costa Atlántica. Este patrón de diferenciación con tres grupos de poblaciones concuerda con lo observado en el análisis bayesiano, así como con las estimaciones del número de migrantes, en las que los valores más bajos se observaron en las comparaciones con FU, y los valores más elevados en las comparaciones en que ambas localidades pertenecían a la misma región (Atlántica o Mediterránea).

En general, la magnitud de la divergencia genética entre poblaciones es un balance entre los efectos homogenizadores del flujo génico y los efectos perturbadores de la

deriva genética (Allendorf y col., 2013). Slatkin (1987) propuso que un migrante por generación es suficiente para amortiguar la diferenciación genética entre poblaciones causada por efecto de la deriva. Sin embargo, en este estudio las estimas de Nm son muy superiores, oscilando entre 4,703 (MA – FU) y 59,519 (AL – VI). A pesar de que Nm es una valiosa medida relativa de la migración entre poblaciones, las estimas indirectas obtenidas a partir de los valores F_{st} deben ser interpretadas con precaución ya que este parámetro se obtiene, en general, a partir de un número pequeño de *loci* y a partir de un número limitado de individuos de unas pocas poblaciones. Además, otra de las limitaciones que presenta este método indirecto es que el Nm no es una función lineal de las estimas F_{st} . Esto da lugar a que pequeñas diferencias en los valores F_{st} pueden resultar en grandes diferencias en las estimas de Nm y, por tanto, pequeños errores en la estimación de los F_{st} se amplifican al calcular el Nm (Whitlock y McCauley, 1999). Asimismo, en general, se asume que las poblaciones han alcanzado un equilibrio entre las fuerzas de migración y deriva genética (Whitlock y McCauley, 1999). Sin embargo, pocas poblaciones naturales están en equilibrio, principalmente porque se necesitan muchas generaciones para alcanzarlo (Allendorf y col., 2013). Así, una expansión poblacional reciente puede provocar que la migración y la deriva genética no hayan tenido tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio y, por tanto, las estimas estarán sesgadas (Whitlock y McCauley, 1999).

Acorde a los resultados obtenidos en los análisis de diferenciación (F_{st} por pares y análisis bayesiano) se establecieron los grupos para los análisis AMOVA. Las agrupaciones analizadas mostraron que el mayor porcentaje de variación entre grupos se obtuvo al considerar tres grupos (Atlántico, Mediterráneo y FU), obteniéndose además significación estadística. Al incluir la localidad FU con las restantes localidades del Mediterráneo, no se detectaron diferencias significativas entre poblaciones dentro de los grupos, lo contrario de lo que sucede al incluirla con las situadas en el Atlántico. Sin embargo, dado los resultados obtenidos sería necesario analizar localidades próximas a FU para confirmar la estructura genética observada. Globalmente, los datos obtenidos sugieren la existencia de diferenciación entre las localidades del Atlántico y el Mediterráneo. La localidad FU, localizada en el mar de Alborán, mostró evidencias de diferenciación con respecto al resto de muestras y podría representar una región con características propias. La diferenciación genética entre regiones del Atlántico y Mediterráneo ha sido observada previamente para otros moluscos bivalvos como el mejillón *M. galloprovincialis* (Quesada y col., 1995a; Diz y Presa, 2008) o la vieira *Pecten maximus* (Ríos y col., 2002). En estos estudios las localidades situadas en el mar de Alborán, como Fuengirola, se agruparon con las

pertenecientes al océano Atlántico. Sin embargo, al igual que se observa en *D. trunculus*, otros bivalvos como la zamburiña *Mimachlamys varia* (Fernández-Moreno y col., 2008) o la volandeira *Aequipecten opercularis* (Arias y col., 2010) mostraron diferenciación entre localidades del Atlántico y Fuengirola.

El test de Mantel reveló una correlación significativa entre las distancias geográfica y genética, aunque con un coeficiente de determinación bajo, incluso cuando se incluyeron únicamente las localidades del Atlántico. Sin embargo, las representaciones gráficas no mostraron un buen ajuste a la regresión lineal a lo largo del rango geográfico y no únicamente al final, donde se espera una mayor variabilidad en los valores F_{st} por pares (Hutchison y Templeton, 1999). Por tanto, los resultados obtenidos no apoyan la existencia de un proceso de aislamiento por distancia. Otros factores, como la existencia de barreras que impiden el flujo génico o la explotación del recurso, podrían conducir al patrón de diferenciación observado.

El estrecho de Gibraltar constituye la zona de transición entre el océano Atlántico y el mar Mediterráneo y representa uno de los límites biogeográficos mejor documentados del ambiente marino, debido tanto a propiedades físicas del pasado como a la situación actual. Durante los últimos 6 millones de años esta región se ha visto afectada por fenómenos geológicos dramáticos así como por fluctuaciones climáticas que han condicionado la distribución de la flora y la fauna. El evento más importante fue el levantamiento tectónico entre la región de la cordillera Bética (sur de la Península Ibérica) y el Rif (norte de Marruecos), originando el cierre de los canales entre el océano Atlántico y el mar Mediterráneo, lo que provocó el aislamiento y el incremento notable de la salinidad del Mediterráneo, un período conocido como crisis salina del Messiniense (Krijgsman y col., 1999; Duggen y col., 2003). Más recientemente, durante el Último Máximo Glacial (LGM: *Last Glacial Maximum*), el descenso en el nivel del mar provocó graves impactos sobre la hidrografía del mar Mediterráneo debido a la reducción en el intercambio de agua a través del estrecho de Gibraltar (Rohling y col., 2009). Actualmente, la existencia de una corriente superficial de agua que fluye desde el Atlántico al Mediterráneo (Bryden y col., 1994) contribuye al mantenimiento de esta barrera biogeográfica. Asimismo, la presencia del frente oceanográfico entre Almería (España) y Orán (Algeria), que se caracteriza por ser una zona de fuertes corrientes con cambios bruscos de temperatura y salinidad (Tintore y col., 1988), supone una barrera para la dispersión de organismos marinos. En las últimas décadas multitud de estudios moleculares han sugerido que el frente Almería – Orán contribuye a la existencia de diferenciación genética entre las localidades

situadas a ambos lados del frente. Este es el caso de diferentes moluscos bivalvos como mejillones (Sanjuan y col., 1994, 1996, 1997; Quesada y col., 1995a, 1995b; Śmietanka y col., 2004; Diz y Presa, 2008; Luis y col., 2011), ostras (Saavedra y col., 1993) o vieiras (Ríos y col., 2002).

Además de la diferenciación observada entre las localidades situadas a ambos lados del frente Almería – Orán, en *D. trunculus* también se ha observado diferenciación entre la localidad FU y las localidades del océano Atlántico. La situación de FU, dentro del mar de Alborán y limitada al este por el frente Almería – Orán y al oeste por el estrecho de Gibraltar, podría contribuir a la diferenciación genética detectada. El análisis de muestras procedentes de regiones próximas y situadas en el mar de Alborán permitiría confirmar la existencia de restricciones al flujo génico en esta área. Asimismo, la diferenciación observada en FU podría relacionarse con la hipótesis del *Sweepstakes Reproductive Success*, que propone la existencia de una elevada varianza en el éxito reproductivo en organismos marinos con alta fecundidad. Esta varianza se debería a la baja probabilidad de que se combine la actividad reproductiva con las condiciones oceanográficas conducentes a la maduración de los gametos, fertilización, desarrollo larvario, fijación y alcance de la edad reproductora. Esto explicaría que especies con amplia dispersión larvaria y elevada similitud genética en escalas espaciales grandes, presenten a menudo heterogeneidad genética caótica en una escala espacial reducida (Hedgecock, 1994; Hedgecock y Pudovkin, 2011). El análisis de muestras temporales podría dilucidar si la existencia de variación en el éxito reproductivo de *D. trunculus* contribuye a la diferenciación de FU. Además, debe considerarse que el marisqueo continuado de coquina ha podido dar lugar a reducciones en la abundancia que contribuyesen a la diferenciación genética detectada en esta localidad. La extracción de los recursos puede conducir a la pérdida de variación genética así como a cambios en la estructura poblacional (Allendorf y col., 2013). El número de alelos y la heterocigosidad podrían ser parámetros indicativos de un declive demográfico causado por la sobreexplotación del recurso (Hauser y col., 2002). Sin embargo, en este caso la localidad FU mostró valores del orden de los observados para el resto de las localidades, por lo que es poco probable que la explotación del recurso haya tenido un efecto determinante.

Diversidad genética y estructura poblacional de *Donax trunculus* en la Península Ibérica mediante marcadores de ADN mitocondrial



4.1. INTRODUCCIÓN

Los marcadores mitocondriales constituyen una herramienta molecular útil para determinar la diversidad y estructura genética de las especies. Diferentes regiones mitocondriales han sido empleadas con este fin en un elevado número de especies de bivalvos como almejas (Mao y col., 2011; Murakami-Sugihara y col., 2012; Ross y col., 2012), berberechos (Tarnowska y col., 2010; Krakau y col., 2012; Martínez y col., 2015), ostras (Huvet y col., 2000; Aranishi, 2006) o mejillones (Ort y Pogson, 2007; Teske y col., 2012; Giantsis y col., 2014). Sin embargo, en el caso de *D. trunculus*, el uso de marcadores mitocondriales se limita al estudio del modo de herencia del ADN mitocondrial (Theologidis y col., 2008).

Dentro de las regiones mitocondriales, los genes que codifican para proteínas son considerados una herramienta eficaz para los análisis de diversidad debido a que presentan una tasa de evolución más rápida que los genes ribosomales (Arif y Khan, 2009). Entre estos genes destacan el gen que codifica para la subunidad I de la citocromo c oxidasa (COI) por ser un marcador molecular ampliamente utilizado en estudios de genética de poblaciones tanto en especies del género *Donax* (Carstensen y col., 2009; Bezuidenhout y col., 2014) como en otros moluscos bivalvos (Cho y col., 2007; Baker y col., 2008; Li y col., 2013; Navarro y col., 2013; Xue y col., 2014). Sin embargo, otras regiones codificantes han sido menos estudiadas con esta finalidad. Entre ellas el gen que codifica para el citocromo b (CytB), que ha sido poco empleado en bivalvos (Dahlgren y col., 2000; Pereira, 2013; Martínez y col., 2015), pero es de uso común en otros organismos marinos (Small y Gosling, 2000a,b; Planes y col., 2001; Lee y Boulding, 2009; Gaither y col., 2010).

En la coquina *D. trunculus* se ha descrito la existencia de DUI y, por tanto, de dos tipos de ADNmt (F y M) (Theologidis y col., 2008). Este modo de herencia constituye un modelo de estudio interesante para diferentes cuestiones biológicas, ya que la combinación de ambos tipos de ADNmt puede aportar información sobre la historia evolutiva y la estructura filogeográfica de las especies, así como, proporcionar una valiosa herramienta para la evaluación genética de las poblaciones y la conservación de especies (Passamonti y Scali, 2001; Breton y col., 2009). Sin embargo, la presencia de dos linajes de genoma mitocondrial que evolucionan de forma independiente dentro de una misma especie constituye un hecho relevante que debe considerarse cuando se emplea el ADNmt para los estudios genético – poblacionales, ya que puede interferir en la interpretación de los resultados poblacionales (Ladoukakis y col., 2002).

En estudios con diferentes especies de mejillón, donde este modo de herencia está ampliamente estudiado, se ha observado que habitualmente el genoma M evoluciona más rápido que el F (Skibinski y col., 1994b; Rawson y Hilbish, 1995; Stewart y col., 1995). En teoría, esta propiedad haría que las secuencias obtenidas a partir del genoma M resulten más adecuadas para investigar la estructura genética de las poblaciones (Śmietanka y col., 2013). Sin embargo, cuando se estudiaron las secuencias de los genomas F y M con esta finalidad no se detectó la existencia de estructuración genética, como es el caso del mejillón *Mytilus californianus* (Ort y Pogson, 2007), o paradójicamente, el genoma F proporcionó una mayor resolución geográfica, como es el caso de las especies *M. galloprovincialis* y *M. edulis* (Śmietanka y col., 2009). Por este motivo, el análisis de ambos tipos de ADNmt puede resultar de gran interés para estudiar la diversidad genética y estructura poblacional en especies con este modo de herencia.

En este capítulo se estudia la diversidad genética y estructura poblacional de la coquina *D. trunculus* en localidades de la costa de la Península Ibérica, mediante el análisis de marcadores mitocondriales basados en los genes CitB y COI.

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1. *Material de estudio y extracción de ADN*

Los individuos de *D. trunculus* analizados proceden de 14 localidades distribuidas a lo largo de la Península Ibérica (corresponden a las localidades empleadas en el Capítulo 3 y presentes en la Figura 3.1 excepto VC, LN y CA). Las muestras que se recibieron vivas se sexaron a su llegada al laboratorio por observación directa de tejido gonadal al microscopio. En el caso de las muestras recibidas en etanol al 96%, para su sexado se realizó una prehidratación previa del tejido gonadal en 500 µl de 1x PBS (tampón fosfato alcalino). A continuación, se disgregó el tejido con la ayuda de unas pinzas y se montó la preparación microscópica.

La extracción de ADN se realizó a partir de tejido de músculo y de gónada de machos y hembras. Para la extracción se empleó un protocolo basado en el desarrollado por Walsh y col. (1991) y la cuantificación del ADN extraído se realizó en un espectrofotómetro nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.).

4.2.2. *Amplificación del gen mitocondrial citocromo b (CitB)*

Se amplificó por PCR un fragmento del gen que codifica para el citocromo b (CitB) empleando los cebadores descritos por Theologidis y col. (2008) (DTCYTB-F: 5'-TGTCGTATTGGGGGGCTACTG-3' y DTCYTB-R: 5'-GTACCACTCTGGCTGAATGTG-3'). Inicialmente se utilizó ADN extraído de músculo y gónada de machos y hembras. Posteriormente, para la evaluación poblacional se empleó tejido muscular de ambos sexos (CitB tipo F) y gonadal únicamente en machos (CitB tipo M) (ver resultados).

La reacción de PCR tuvo lugar en un volumen final de 25 µl, con ~100 ng de ADN, 0,75 U de *Taq* ADN polimerasa, tampón de la polimerasa 1x, 0,25 mM de cada dNTP, 0,6 µM de cada cebador y 2,5 mM de MgCl₂. El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min; 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min 20 s a 50 °C, y 1 min a 72 °C; seguidos de una extensión final a 72 °C durante 5 min. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2% en 1xTAE y la secuenciación se realizó en los *Servicios de Apoyo á Investigación (SAI) de la Universidade da Coruña*.

4.2.3. Amplificación del gen citocromo c oxidasa subunidad I (COI)

Un fragmento del gen citocromo c oxidasa subunidad I (COI) se amplificó empleando dos pares de cebadores. En un principio se utilizaron los cebadores universales HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') y LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') (Folmer y col., 1994). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl con ~100 ng de ADN, 0,6 U de *Taq* ADN polimerasa, tampón de la polimerasa 1x, 0,2 mM de cada dNTP, 0,6 µM de cada cebador y 2 mM de MgCl₂. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min; 34 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 41 °C y 45 s a 72 °C; seguidos de una extensión final a 72 °C durante 3 min. La visualización y secuenciación de los productos de amplificación se realizó como para el *CitB*.

Dada la existencia de bandas inespecíficas en varios de los individuos amplificados, se llevó a cabo el diseño de unos cebadores específicos a partir de las secuencias obtenidas en los individuos cuya amplificación fue óptima. La nueva pareja de cebadores (COIDtr-F: 5'-CCTTGTGGGGCTGGTCTATA-3' y COIDtr-R: 5'-CAGCCACCAACAGGAAAGAC-3') se diseñó empleando el programa Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000). Dado que no se consiguió amplificación del tipo M usando ADN extraído del tejido gonadal de macho, a pesar de los intentos de optimización, la amplificación del COI se hizo únicamente a partir de tejido muscular (tipo F). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl con ~100 ng de ADN, 0,75 U de *Taq* ADN polimerasa, tampón de la polimerasa 1x, 0,25 mM de cada dNTP, 0,6 µM de cada cebador y 1,5 mM de MgCl₂. El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min; 34 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 56 °C y 45 s a 72 °C; seguidos de una extensión final a 72 °C durante 3 min. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2% en 1xTAE y la secuenciación se realizó en los SAI de la Universidad de Coruña.

4.2.4. Análisis comparativo *CitB* tipo F y M: diversidad nucleotídica y test de selección

La composición nucleotídica de las secuencias *CitB* tipo F y M se calculó empleando el programa MEGA 5.05 (Tamura y col., 2011). Este programa también se usó para estimar las distancias sinónimas (K_S) y no sinónimas (K_A) empleando el método Nei-Gojobori con la corrección Jukes-Cantor. Para calcular estas distancias se obtuvo el alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los tipos F y M tras el alineamiento previo de las secuencias aminoacídicas. Con el objetivo de analizar la existencia de

desviaciones de la neutralidad también se empleó el test de McDonald y Kreitman y el test D de Tajima, ambos implementados en el programa DnaSp v.5.10 (Librado y Rozas, 2009). El test de McDonald y Kreitman se basa en la comparación de la variación sinónima y no sinónima dentro de y entre linajes. Bajo la hipótesis de neutralidad, la proporción entre el número de sitios polimórficos dentro de uno o más linajes y sitios fijados entre linajes debe ser idéntica para las sustituciones sinónimas y no sinónimas. Asimismo, para evaluar la evolución neutral de las secuencias se comparó la magnitud del test D de Tajima para ambos tipos mitocondriales, tanto por localidad como total. Este test se basa en la comparación entre el número de sitios segregantes y el número de diferencias entre pares de haplotipos.

4.2.5. Análisis de diversidad genética y diferenciación poblacional

Las secuencias obtenidas se editaron con el programa BioEdit v.7.0.9 (Hall, 1999), eliminando los extremos de las secuencias donde la lectura es ambigua. La identidad de las secuencias se verificó empleando la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul y col., 1990) disponible *online* en la plataforma del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Las secuencias editadas se alinearon con el programa Clustal W (Thompson y col., 1994), implementado en el programa BioEdit. Al tratarse de genes codificantes para proteínas, los alineamientos se realizaron tanto con las secuencias nucleotídicas como con las secuencias aminoácidas, respetando la pauta de lectura, para determinar el número de sustituciones sinónimas y no sinónimas. Los análisis se realizaron para cada gen por separado.

La heterogeneidad genética dentro de las localidades se estimó como diversidad haplotípica (H_d) y nucleotídica (π). Estos parámetros se calcularon empleando el programa DnaSp v.5.10 (Librado y Rozas, 2009). Las frecuencias haplotípicas se calcularon con el programa Arlequin v.3.11 (Excoffier y col., 2005). Los valores observados de diversidad genética se compararon mediante un procedimiento de remuestreo implementado en R (R Core Team, 2014). Se utilizó como tamaño muestral el número mínimo de individuos analizados por gen y 10 000 remuestreos. La comparación se realizó empleando los valores medios de diversidad haplotípica y nucleotídica e intervalos de confianza del 95%.

La estructura poblacional de las localidades muestreadas se analizó con el programa Arlequin v.3.11 mediante el análisis molecular de la varianza (AMOVA) con 10 000

permutaciones. Este programa también se utilizó para estimar los valores F_{st} por pares de localidades en base a la matriz de distancias nucleotídicas. Estas distancias se calcularon según el método Jukes-Cantor (1969), que asume que todas las sustituciones nucleotídicas presentan la misma probabilidad. Los valores F_{st} por pares de localidades se representaron gráficamente mediante un escalamiento multidimensional no métrico (nMDS) obtenido mediante el paquete estadístico SPSS 16.0 (SPSS Inc.). En los casos en que se realizaron test múltiples, los valores de significación se ajustaron mediante la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989).

La correlación lineal entre la distancia genética medida como $F_{st}/(1-F_{st})$ (Rousset, 1997) y la distancia geográfica, en Km, a lo largo de la línea de costa entre pares de localidades se analizó mediante un test de Mantel con 10 000 aleatorizaciones utilizando el programa IBDWS v.3.23 (Jensen y col., 2005).

4.2.6. Análisis de inferencia demográfica y test de selección

Las relaciones entre los haplotipos se evaluaron mediante redes de haplotipos construidas con el programa Network v.4.6.1.3 (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>) empleando el algoritmo *Median-Joining* (Bandelt y col., 1999). Para determinar la posible existencia de expansiones poblacionales y analizar si los patrones de diversidad corresponden a los esperados bajo neutralidad, se realizaron los tests D de Tajima (Tajima, 1989), F_s de Fu (Fu, 1997) y R_2 de Ramos-Onsis y Rozas (Ramos-Onsis y Rozas, 2002) en el programa DnaSP v.5.10, determinándose la significación por simulación coalescente (1000 réplicas). El test F_s de Fu se calcula a partir de la probabilidad de tener una muestra aleatoria con un número de alelos mayor o igual que el observado dado el nivel de diversidad estimado. Un valor negativo de F_s evidencia un exceso de haplotipos, esperable en una situación de expansión poblacional reciente o selección purificadora, mientras que un valor positivo indica un déficit de haplotipos, esperable en una situación de cuello de botella reciente o sobredominancia. El estadístico R_2 de Ramos-Onsis y Rozas se basa en la diferencia entre el número de variantes únicas y el número medio de diferencias entre secuencias. Valores bajos de este estimador evidencian un crecimiento poblacional reciente. Asimismo se analizó la distribución de *mismatches* (Rogers y Harpending, 1992), donde las diferencias entre pares de haplotipos se representan frente a las esperadas en caso de expansión poblacional.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Identificación de los tipos mitocondriales F y M

Dada la existencia de DUI en la coquina *D. trunculus* (Theologidis y col., 2008) se trató de identificar los tipos F y M en los genes CitB y COI. Para ello, se secuenciaron los productos de amplificación obtenidos de ADN extraído de tejido muscular y gonadal en 10 machos y 10 hembras. En el caso del gen COI las secuencias obtenidas no mostraron diferencias asociables al sexo o al tejido, por lo que este gen se amplificó únicamente empleando tejido muscular en todos los individuos analizados. Sin embargo, para el gen CitB, las secuencias obtenidas a partir de ADN extraído de gónada de hembras y de músculo de ambos sexos mostraron un elevado número de diferencias con las secuencias obtenidas a partir de gónada de machos. Al comprobar la identidad de las secuencias se observó que las secuencias amplificadas a partir de gónada de hembra y músculo de ambos sexos mostraban un elevado grado de similitud con la secuencia del gen CitB tipo F descrita por Theologidis y col. (2008) para *D. trunculus*, mientras que las secuencias obtenidas de gónada de macho presentaban un elevado porcentaje de similitud con la secuencia descrita por estos autores para el tipo M. Debido a esto, los análisis poblacionales se realizaron por separado en los tipos F y M para el gen CitB, amplificándose el primero a partir de ADN extraído de músculo de machos y hembras y el segundo a partir de gónada de machos. Los análisis poblacionales del gen COI, por su parte, se hicieron amplificando únicamente este gen a partir de tejido muscular en todos los individuos analizados.

Para el gen CitB tipo F se analizó un fragmento de 329 pb en 389 individuos de las 14 localidades muestreadas (20 – 34 individuos por localidad), mientras que para el tipo M el fragmento analizado fue de 326 pb y se obtuvo para un total de 182 individuos (8 – 16 individuos por localidad). Los dos tipos de CitB resultaron ricos en AT (F=58,2% y M=56,8%) y la composición nucleotídica fue similar entre ambos. Las distancias sinónima (K_S) y no sinónima (K_A) estimadas para el alineamiento de las secuencias nucleotídicas fueron 1,233 (desviación estándar=0,262) y 0,311 (desviación estándar=0,066), respectivamente. El mayor valor de K_S frente a K_A sugiere que el gen CitB está sometido a selección purificadora o negativa.

La posible existencia de desviaciones de la neutralidad también se analizó con el test de McDonald y Kreitman (Tabla 4.1). La proporción entre sustituciones polimórficas y fijadas (P/F) resultó significativamente más baja en las no sinónimas que en las

sinónimas, lo que indica que ambos tipos de CitB (F y M) no evolucionan según el modelo de evolución neutral. El exceso de sustituciones no sinónimas fijadas observado sugiere la existencia de selección positiva.

Tabla 4.1. Número de sustituciones sinónimas y no sinónimas fijadas (F) y polimórficas (P) entre los tipos F y M del CitB

	SUSTITUCIONES			
	F	P	P/F	P
No sinónimas	47	14	0,298	<0,00,
Sinónimas	31	95	3,065	

P: probabilidad del test exacto de Fisher (dos colas)

El valor *D* del test de Tajima (Tabla 4.2) indicó un exceso de polimorfismos de baja frecuencia, dando lugar a valores negativos y significativos en la mayor parte de las localidades, excepto CR, DE y MA, en el caso del CitB tipo F. Estos resultados sugieren procesos de expansión poblacional recientes y/o la actuación de selección purificadora. Sin embargo, en el caso del CitB tipo M únicamente se observaron valores significativos en cuatro localidades (VI, BS, MG y MA), lo que sugiere una relajación de la presión selectiva.

Tabla 4.2. Test *D* de Tajima para ambos tipos de CitB por localidad y total

LOCALIDAD	CitB tipo F	CitB tipo M
AL	-2,137*	-1,270
BQ	-2,079*	-1,017
CR	-1,670	-1,697
VI	-2,047*	-2,015*
BS	-2,086*	-1,894*
CL	-2,350**	-1,652
LZ	-2,024*	-1,410
SE	-1,868*	-1,448
MG	-2,133*	-1,897*
MÑ	-2,010*	-1,129
FU	-2,252**	0,517
GA	-1,842*	0,049
DE	-1,782	-1,573
MA	-1,682	-2,134**
TOTAL	-2,520**	-1,291

(*) *P* valor <0,05 (**) *P* valor <0,01

4.3.2. Alineamiento de secuencias e identificación de haplotipos

4.3.2.1. *CitB* F y M

El alineamiento de las 389 secuencias obtenidas para el gen *CitB* tipo F mostró 73 posiciones variables, comprendiendo 69 transiciones, 3 transversiones y 1 transición/transversión. Las secuencias aminoacídicas revelaron la existencia de cuatro sustituciones no sinónimas. Se identificaron un total de 87 haplotipos (ver Material suplementario I en CD anexo), 61 fueron privados, y solamente el haplotipo H1 estuvo presente en todas las localidades estudiadas (ANEXO D). El haplotipo H1 fue el más abundante tanto globalmente (50,64%) como por localidad (23,08% - 65,52%). Los haplotipos H9 y H11 también se identificaron en nueve de las 14 localidades estudiadas, pero sus abundancias globales fueron muy inferiores, 3,08% y 6,68%, respectivamente.

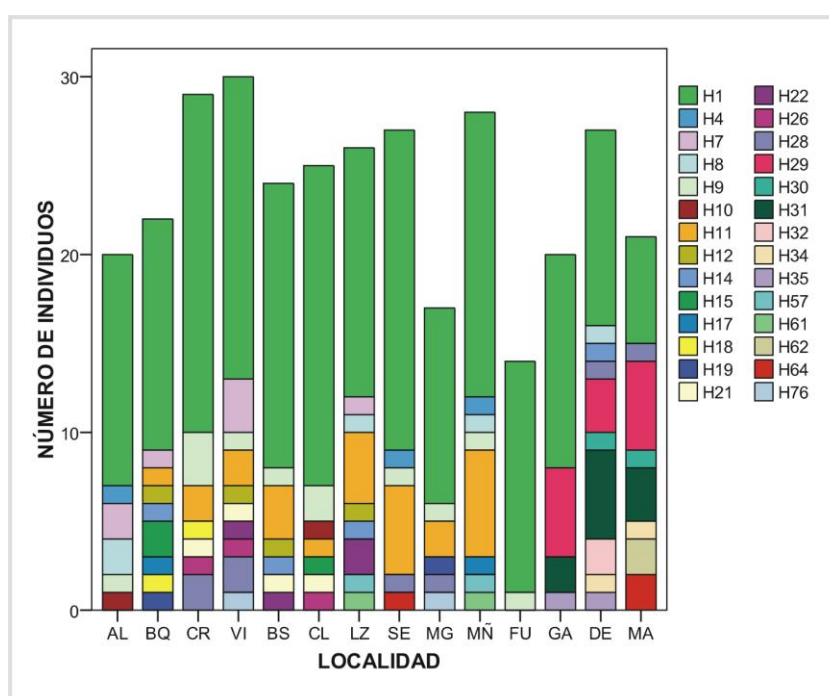


Figura 4.1. Distribución de los haplotipos del gen *CitB* tipo F en las localidades de estudio. Los haplotipos se representan con colores y la altura de las barras es proporcional a las frecuencias haplotípicas. Los haplotipos únicos no están representados

Los haplotipos H29 y H31 sólo se observaron en tres de las localidades (DE, GA y MA) pero con frecuencias globales próximas o superiores al 3% (Figura 4.1). El resto de haplotipos se encontraron en frecuencias inferiores al 2,5%. Todas las localidades

salvo CR presentaron haplotipos privados, variando el número entre 2 (BQ, VI y BS) y 9 (MG y GA). Los haplotipos privados fueron siempre únicos a excepción de los haplotipos H32 y H62 con dos copias en DE y MA, respectivamente (ANEXO D). Estas dos localidades fueron las que compartieron un mayor número de haplotipos (6).

En el caso del CitB tipo M el alineamiento de las 182 secuencias reveló 56 sitios variables, de ellos 41 transiciones, 12 transversiones y 3 transiciones/transversiones. Las secuencias aminoacídicas mostraron 12 sustituciones no sinónimas. Las cincuenta y seis posiciones variables definieron un total de 51 haplotipos (ver Material suplementario II en CD anexo), de los cuales 40 fueron privados, y ninguno se identificó en todas las localidades estudiadas. El haplotipo H1 fue el más abundante tanto globalmente (52,20%) como por localidad (33,33% - 81,25%), y se identificó en todas las localidades excepto en DE y MA. En la localidad de GA, los tres haplotipos no únicos identificados (H1, H17 y H22) presentaron la misma frecuencia (1,10%) (ANEXO E). El haplotipo H17 sólo se identificó en tres localidades (DE, GA y MA) (Figura 4.2) y su frecuencia global fue inferior al 7%, pero sus frecuencias por localidad fueron elevadas (20% - 54,55%) (ANEXO E).

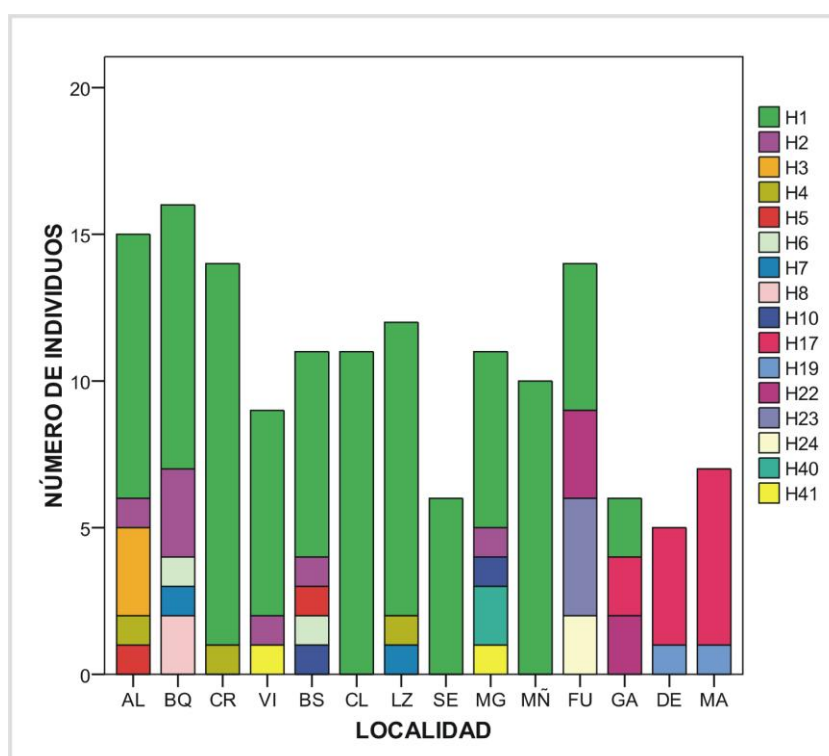


Figura 4.2. Distribución de los haplotipos del gen CitB tipo M en las localidades de estudio. Los haplotipos se representan con colores y la altura de las barras es proporcional a las frecuencias haplotípicas. Los haplotipos únicos no están representados

El haplotipo H19 únicamente se detectó en las localidades DE y MA con una frecuencia global baja (1,10%). El resto de haplotipos se encontraron poco representados en todas las localidades, con frecuencias globales que oscilaron entre 0,55% y 2,75%. Todas las localidades presentaron haplotipos privados, variando el número entre 1 (AI y BQ) y 6 (VI). De los 40 haplotipos privados identificados, 5 (H3, H8, H23, H24 y H40) mostraron entre 3 y 4 copias por localidad, siendo el resto únicos. El mayor número de haplotipos compartidos fue 3, entre las parejas de localidades AL – BS, BQ – BS, VI – MG y BS – MG (Figura 4.2).

4.3.2.2. COI

Se analizó un fragmento de 422 pb en 425 individuos (27 – 33 individuos por localidad). Un total de 82 posiciones nucleotídicas fueron variables, comprendiendo 64 transiciones, 12 transversiones y 6 transiciones/transversiones. El alineamiento de las secuencias aminoacídicas mostró cinco sustituciones no sinónimas. Se identificaron un total de 109 haplotipos (ver Material suplementario III en CD anexo), de los cuales 75 fueron privados. El haplotipo H2 fue el único presente en todas las localidades estudiadas siendo además el más abundante globalmente (29,88%), aunque con frecuencias dispares en las localidades (entre un 3,33% en MA y un 50% en CL) (ANEXO F). Los haplotipos H3 y H4 estuvieron representados en 12 y 11 localidades respectivamente, pero con frecuencias globales no muy altas, 7,06% y 9,41% respectivamente. La frecuencia global de los demás haplotipos varió del 0,24% al 3,53%. Todas las localidades mostraron haplotipos privados, variando el número entre 1 (BS y CL) y 15 (FU). De los 75 haplotipos privados, tres de ellos (H70, H73 y H80) mostraron frecuencias absolutas de 2, siendo el resto únicos. El mayor número de haplotipos compartidos fue 7 entre los pares de localidades CR – BS, GA – DE y GA – MA (Figura 4.3). Además, destaca la existencia de un total de 5 haplotipos (H2, H40, H41, H44 y H48) compartidos por las localidades de DE, GA y MA que aparecen únicamente en estas tres localidades, excepto H2 que lo hace en todas (Figura 4.3).

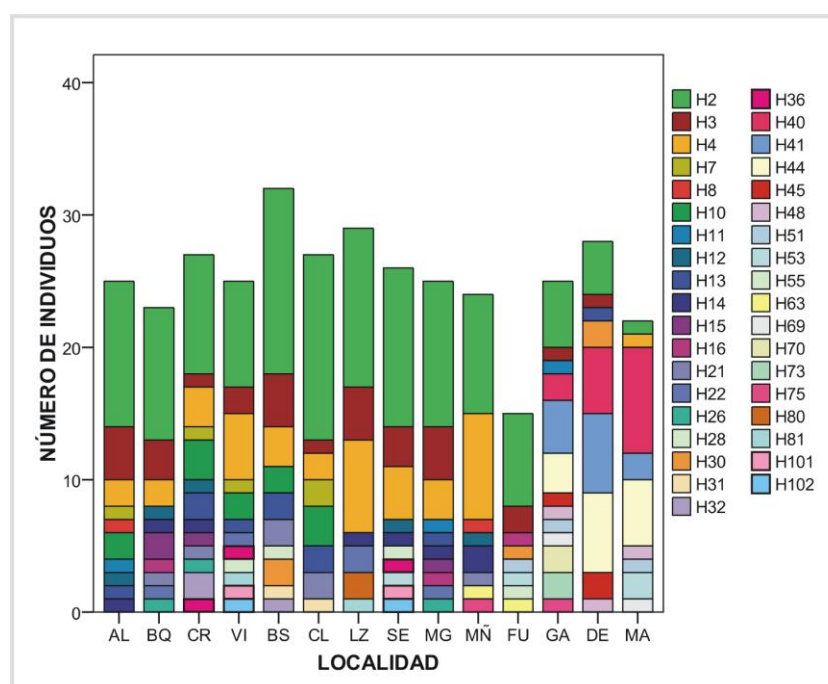


Figura 4.3. Distribución de los haplotipos del gen COI en las localidades de estudio. Los haplotipos se representan con colores y la altura de las barras es proporcional a las frecuencias haplotípicas. Los haplotipos únicos no están representados

4.3.3. Estimaciones de diversidad genética

La Tabla 4.3 muestra el nivel de variación, tanto global como por localidad, medida como diversidad haplotípica (H_d) y nucleotídica (π). Globalmente, la diversidad haplotípica observada para cada gen fue elevada (CitB tipo F: 0,736; CitB tipo M: 0,722; COI: 0,892). Dentro de las localidades, los valores de diversidad haplotípica oscilaron entre 0,567 (CR) y 0,908 (MA) en el caso del CitB tipo F, y entre 0,182 (MÑ) y 0,933 (GA) en el tipo M. Para el COI el rango de valores fue menor, entre 0,741 (CL) y 0,949 (FU y GA). Mediante un procedimiento de remuestreo se calculó para cada localidad el valor medio de diversidad haplotípica y su intervalo de confianza (Figura 4.4). En la mayor parte de los casos los intervalos de confianza se solaparon indicando niveles similares de diversidad. Sin embargo, en el caso del gen CitB tipo F los intervalos de confianza de MA y CR no se solaparon, y los de MA con FU, CL y BS presentaron un solapamiento mínimo. En el caso del CitB tipo M, los intervalos de confianza de la localidad GA, que mostró los valores más elevados de diversidad haplotípica, no se solaparon con los de CL y MÑ, ambas localidades con menor diversidad haplotípica. Por último, en el gen COI, los intervalos de confianza de la localidad con mayor diversidad haplotípica, GA, tampoco mostraron solapamiento con las dos localidades de menor diversidad haplotípica, CL y LZ.

Tabla 4.3. Estimaciones de diversidad genética para los genes CitB (tipos F y M) y COI

Localidad	CitB tipo F				CitB tipo M				COI			
	<i>N</i>	<i>h</i>	π	<i>Hd</i>	<i>N</i>	<i>h</i>	π	<i>Hd</i>	<i>N</i>	<i>h</i>	π	<i>Hd</i>
AL	24	10	0,0052	0,710	15	5	0,0023	0,629	29	14	0,0058	0,845
BQ	24	11	0,0035	0,714	16	5	0,0032	0,667	31	18	0,0053	0,893
CR	29	7	0,0028	0,567	16	4	0,0012	0,350	32	18	0,0068	0,911
VI	32	12	0,0044	0,716	15	9	0,0045	0,800	27	14	0,0053	0,886
BS	26	9	0,0025	0,622	12	6	0,0031	0,682	33	11	0,0051	0,803
CL	28	10	0,0037	0,593	13	3	0,0014	0,295	28	9	0,0043	0,741
LZ	29	12	0,0040	0,759	15	6	0,0028	0,571	31	9	0,0040	0,796
SE	31	10	0,0035	0,650	8	3	0,0023	0,464	31	15	0,0050	0,839
MG	26	15	0,0050	0,828	15	9	0,0048	0,848	29	14	0,0047	0,842
MÑ	31	11	0,0039	0,710	11	2	0,0006	0,182	31	15	0,0046	0,860
FU	20	8	0,0043	0,590	15	5	0,0044	0,810	30	23	0,0079	0,949
GA	29	13	0,0049	0,810	10	7	0,0332	0,933	30	18	0,0066	0,949
DE	34	17	0,0063	0,877	10	7	0,0048	0,867	33	14	0,0057	0,909
MA	26	13	0,0081	0,908	11	6	0,0190	0,727	30	17	0,0064	0,908
Global	389	87	0,0046	0,736	182	51	0,0195	0,722	425	109	0,0062	0,892

N: tamaño muestral; *h*: número de haplotipos; π : diversidad nucleotídica; *Hd*: diversidad haplotípica

Respecto a la diversidad nucleotídica, los valores globales fueron bajos (CitB tipo F: 0,0046; CitB tipo M: 0,0195; COI: 0,0062), aunque en el caso del CitB tipo M el valor observado fue muy superior al obtenido en los otros dos casos (Tabla 4.4). Dentro de las localidades, los valores de diversidad nucleotídica oscilaron entre 0,0025 (BS) y 0,0081 (MA) en el caso del CitB tipo F, entre 0,0006 (MÑ) y 0,0332 (GA) en el tipo M, y entre 0,0040 (LZ) y 0,0079 (FU) en el COI. Al aplicar el mismo procedimiento de remuestreo a la diversidad nucleotídica, se observó la ausencia de solapamiento de los intervalos de confianza en las comparaciones de varias localidades, indicando la existencia de valores de diversidad diferentes (Figura 4.4). En el caso del CitB tipo F los intervalos de confianza de la localidad con el valor de diversidad nucleotídica más elevado, MA, no se solaparon con los intervalos de las localidades que mostraron los valores más bajos para este índice, BQ, CR y BS. Para el CitB tipo M, las diferencias de diversidad entre localidades fueron más notables y la localidad GA únicamente mostró un claro solapamiento de su intervalo de confianza con el de MA, ambas localidades con valores más elevados de diversidad nucleotídica para este gen. Por último, en el caso del gen COI, el intervalo de confianza de la localidad LZ, con el valor de diversidad nucleotídica más bajo, no se solapó con los de FU y GA, ambas localidades con valores elevados para este índice.

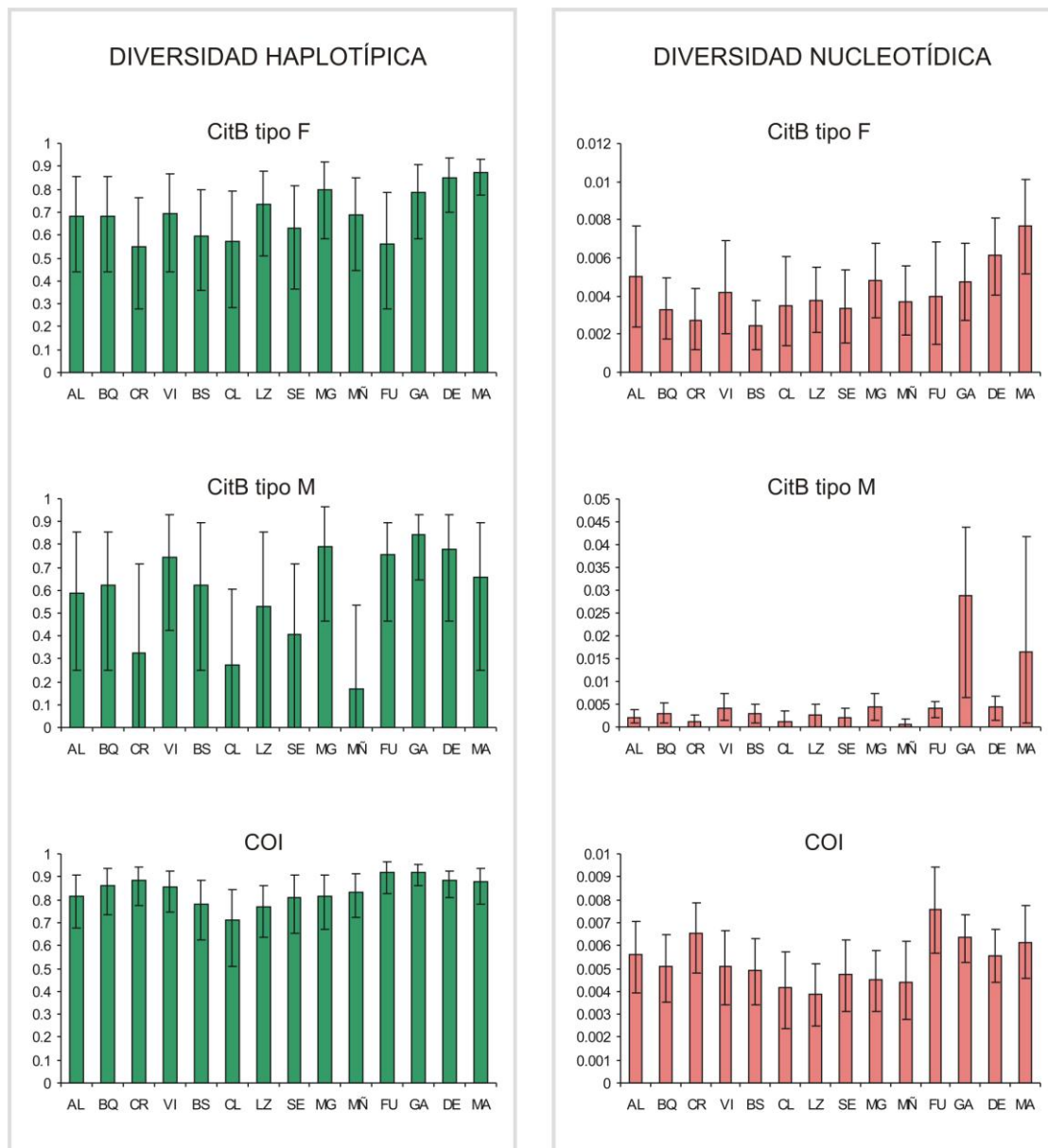


Figura 4.4. Intervalos de confianza de las medias de diversidad haplotípica y nucleotídica para los genes CitB tipo F, CitB tipo M y COI

4.3.4. Estructura poblacional

Los valores F_{st} globales obtenidos a partir de los haplotipos de los genes CitB tipo F, CitB tipo M y COI fueron de 0,028, 0,760 y 0,109 respectivamente, siendo significativamente distintos de cero ($P < 0,001$) en todos los casos. Las Tablas 4.4 y 4.5 recogen los valores F_{st} por pares de localidades para los genes CitB tipo F y M, y para el gen COI, respectivamente. En el caso del CitB tipo F sólo nueve combinaciones fueron significativas tras la corrección secuencial de Bonferroni, mientras que en el caso del CitB tipo M y del COI se observaron 40 y 33 combinaciones significativas, respectivamente. Todas las comparaciones que mostraron valores F_{st} elevados y

significativos incluían a las localidades GA, DE o MA. En el caso del CitB tipo M, la localidad FU también mostró un considerable grado de diferenciación con el resto de localidades, con 9 comparaciones significativas tras Bonferroni.

Tabla 4.4. Valores *F_{st}* por pares de localidades en el CitB tipo F (sobre la diagonal) y CitB tipo M (bajo la diagonal).

	AL	BQ	CR	VI	BS	CL	LZ	SE	MG	MÑ	FU	GA	DE	MA
AL		-0,007	-0,002	-0,016	-0,004	-0,014	-0,001	-0,004	-0,013	0,017	-0,004	0,031*	0,049*	0,064*
BQ	-0,007		0,015	-0,006	-0,011	-0,003	-0,006	0,002	0,012	0,013	0,014	0,048*	0,066*	0,088**
CR	0,037	0,055		-0,002	-0,006	-0,021	0,025*	0,003	-0,002	0,031	-0,012	0,022	0,046*	0,060*
VI	0,026	0,016	0,011		-0,008	-0,004	-0,009	-0,016	-0,005	0,005	0,006	0,046*	0,067**	0,083**
BS	-0,030	-0,021	0,010	-0,013		-0,014	-0,010	-0,006	0,008	0,010	0,002	0,037*	0,057*	0,076*
CL	0,043	0,021	0,003	0,003	0,002		0,016	0,009	-0,002	0,034*	-0,013	0,021	0,043*	0,062*
LZ	0,026	0,053*	0,019	0,018	-0,001	0,025		-0,009	0,016	-0,011	0,028*	0,058**	0,077**	0,097**
SE	0,039	0,034	0,026	-0,024	-0,005	0,014	0,019		0,006	-0,006	0,012	0,043*	0,062*	0,072*
MG	0,017	0,010	0,029	0,009	-0,016	0,010	0,039*	-0,010		0,027*	0,004	0,035*	0,055*	0,068*
MÑ	0,039	0,038	-0,009	-0,011	-0,008	-0,006	0,016	0,024	0,007		0,049*	0,076**	0,092**	0,103**
FU	0,355**	0,330**	0,390**	0,276**	0,313**	0,362**	0,333**	0,312*	0,288**	0,374*		-0,004	0,011	0,034
GA	0,250**	0,235**	0,258**	0,237**	0,205**	0,220**	0,242**	0,162*	0,241**	0,198**	0,146*		-0,005	0,016
DE	0,969**	0,963**	0,976**	0,957**	0,963**	0,972**	0,966**	0,965**	0,956**	0,975**	0,958**	0,728**		0,003
MA	0,875**	0,870**	0,884**	0,864**	0,857**	0,869**	0,872**	0,840**	0,863**	0,863**	0,865**	0,591*	-0,009	

(*) significativo para un $\alpha = 0,05$; (**) significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni

Tabla 4.5. Valores *F_{st}* por pares de localidades en el COI

	BQ	CR	VI	BS	CL	LZ	SE	MG	MÑ	FU	GA	DE	MA
AL	-0,011	-0,024	0,007	-0,017	-0,002	0,032	-0,011	-0,011	0,074*	0,004	0,161**	0,268**	0,232**
BQ		0,002	-0,003	-0,005	-0,005	-0,001	-0,017	-0,021	0,038*	0,019	0,186**	0,302**	0,264**
CR			0,016	-0,016	0,004	0,044*	0,002	-0,001	0,080*	0,005	0,148**	0,243**	0,208**
VI				0,001	-0,012	-0,017	-0,016	-0,015	0,003	0,029	0,187**	0,302**	0,260**
BS					-0,013	0,023	-0,011	-0,013	0,060*	-0,001	0,156**	0,262**	0,223**
CL						0,011	-0,009	-0,011	0,038*	0,016	0,181**	0,301**	0,262**
LZ							-0,003	-0,007	-0,002	0,050*	0,222**	0,346**	0,304**
SE								-0,021	0,029	0,012	0,178**	0,295**	0,254**
MG									0,023	0,009	0,173**	0,291**	0,249**
MÑ										0,078**	0,227**	0,345**	0,304**
FU											0,061*	0,145**	0,115**
GA												0,008	0,004
DE													-0,008

(*) significativo para un $\alpha = 0,05$; (**) significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni

En la Figura 4.5 se muestra la representación de los valores F_{st} por pares mediante el análisis nMDS obtenido para cada gen. Tanto en el CitB tipo F como en el COI las localidades GA, DE y MA se agrupan juntas en un extremo del eje de abscisas y separadas del resto de localidades. En el caso del CitB tipo M, las localidades FU y GA ocupan una posición intermedia entre el grupo formado por las localidades MA y DE, y el constituido por el resto de localidades. El bajo nivel de la fórmula de estrés 1 obtenido en los tres casos (CitB tipo F=0,078; CitB tipo M=0,047; COI=0,047) indica que el escalamiento multidimensional constituye una buena representación de los datos, siguiendo las directrices descritas por Kruskal (1964).

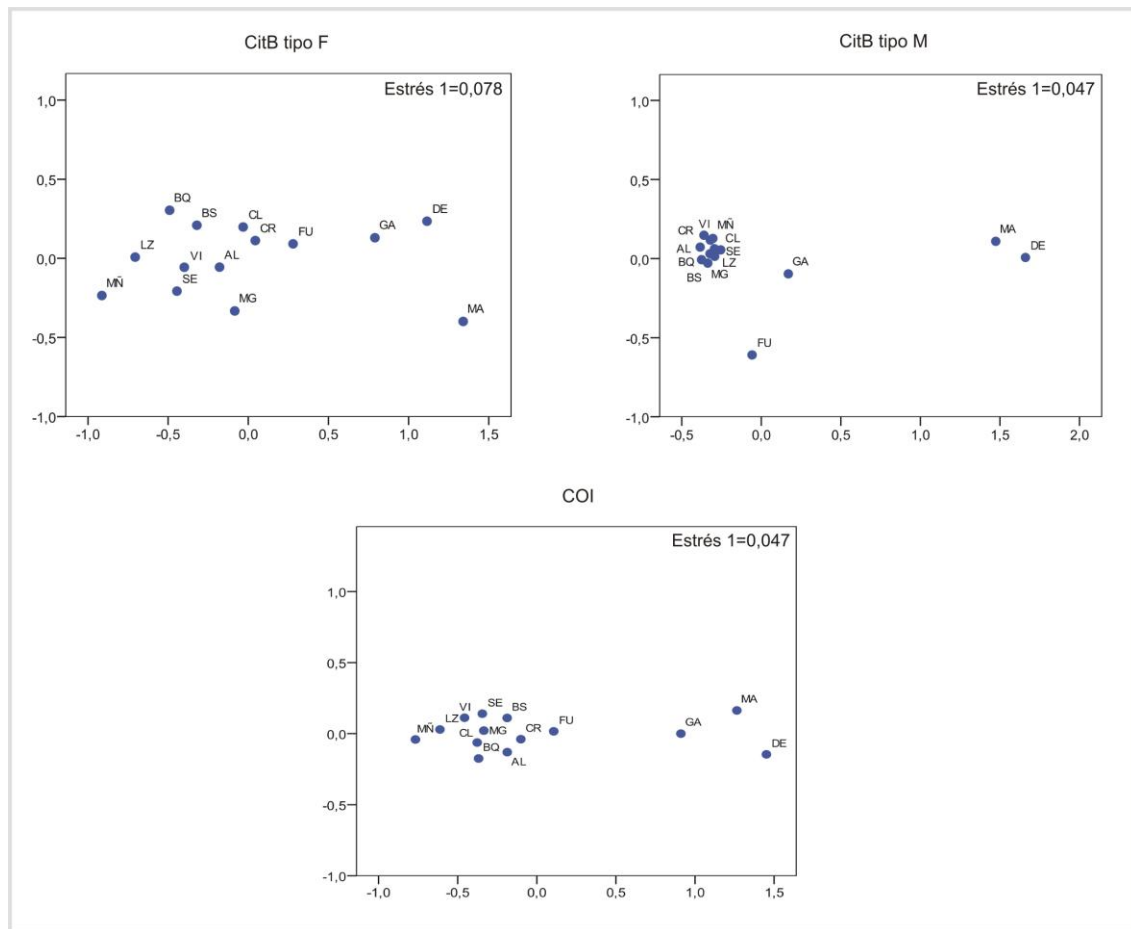


Figura 4.5. Representación del nMDS realizado sobre la matriz de valores F_{st} entre pares de localidades para cada uno de los genes analizados

Al analizar conjuntamente los valores F_{st} por pares de localidades (Tabla 4.5 y Tabla 4.6) para cada gen así como la representación gráfica de estos valores mediante nMDS (Figura 4.5) o la distribución de los haplotipos por localidad (Figura 4.1, Figura 4.2 y Figura 4.3), se pueden identificar dos grupos de poblaciones. Un grupo está formado por las localidades del Mediterráneo (GA, DE y MA) menos FU, que se incluye en el otro grupo con las localidades restantes. Las localidades GA, DE y MA se

caracterizaron por presentar una elevada frecuencia de determinados haplotipos (CitB tipo F: H29 y H31, CitB tipo M: H17 y COI: H40, H41, H44 y H48) que estuvieron ausentes en el resto de localidades. Estos dos grupos de muestras, denominados Atlántico (AL, BQ, CR, VI, BS, CL, LZ SE MG, MÑ y FU) y Mediterráneo (GA, DE y MA), se utilizaron para realizar un análisis AMOVA.

La Tabla 4.6 muestra los resultados del análisis AMOVA. El análisis con los tres genes mostró que un porcentaje significativo de la variación se debe a las diferencias entre las dos regiones identificadas, aunque este porcentaje fue mucho mayor en el CitB tipo M (81,18%) que en el tipo F y COI (6,79% y 23,75%, respectivamente). El porcentaje de variación entre las poblaciones dentro de los grupos fue bajo en el CitB tipo F y en el COI (0,12% y 0,56%, respectivamente), pero para el CitB tipo M este porcentaje fue mayor (8,37%) y significativo. Tanto el CitB tipo F como en COI la mayor parte de la variación corresponde a las diferencias existentes entre los individuos (93,09% y 75,69%, respectivamente) mientras que en el CitB tipo M esta variación sólo representa un 10% del total.

Tabla 4.6. Análisis molecular de la varianza describiendo la división de la variación genética en las muestras de *D. trunculus*

		Fuente de variación		
		Entre grupos	Entre poblaciones dentro de grupos	Dentro poblaciones
CitB tipo F	Porcentaje de variación	6,79	0,12	93,09
	Índice de fijación	$F_{ct}=0,068^*$	$F_{sc}=0,001$	$F_{st}=0,069^*$
CitB tipo M	Porcentaje de variación	81,18	8,37	10,45
	Índice de fijación	$F_{ct}=0,812^*$	$F_{sc}=0,445^{**}$	$F_{st}=0,896^*$
COI	Porcentaje de variación	23,75	0,56	75,69
	Índice de fijación	$F_{ct}=0,238^*$	$F_{sc}=0,007$	$F_{st}=0,243^*$

(*) significativo para un $\alpha = 0,05$

La Figura 4.6 muestra los resultados de los tests de Mantel realizados. Al incluir todas las localidades se observó una correlación significativa entre la distancia genética y la geográfica con todos los genes analizados (CitB tipo F, CitB tipo M y COI). Estos resultados indicarían la existencia de procesos de aislamiento por distancia en las localidades evaluadas. Sin embargo, el ajuste de los valores a la recta de regresión es reducido por lo que la variación explicada por la recta de regresión es baja. Al excluir las localidades del Mediterráneo (GA, DE y MA) la correlación sólo resultó significativa

en el caso del CitB tipo M para un $\alpha=0,05$. La ausencia de significación para el CitB tipo F y el COI sugiere que la relación entre la distancia genética y geográfica observada previamente con todas las localidades podría ser un artefacto causado por la fuerte diferenciación de las muestras mediterráneas respecto a las atlánticas, y los valores no mostraron una distribución lineal. El test de Mantel no se llevó a cabo para la región del Mediterráneo debido al bajo número de localidades disponibles.

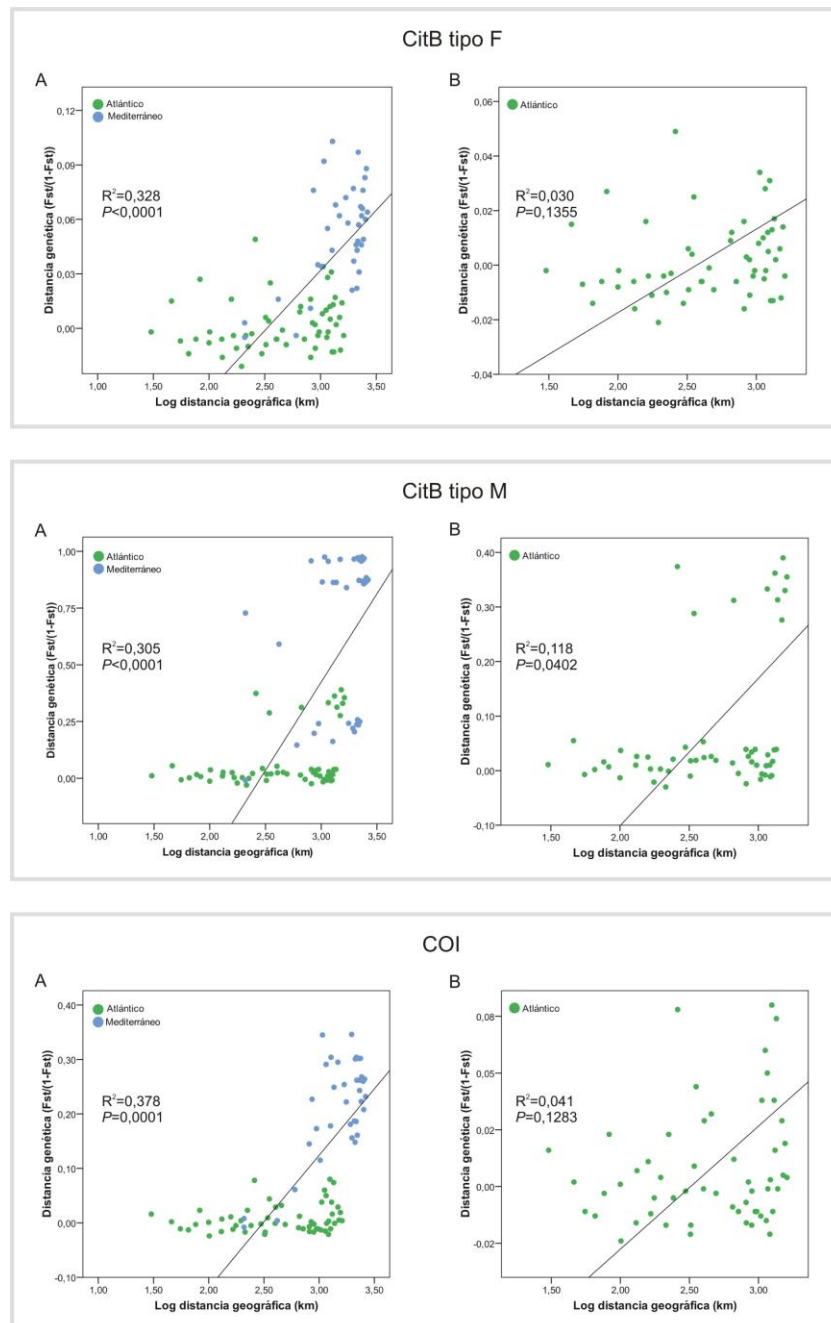


Figura 4.6. Relación entre la distancia genética entre pares de localidades y la distancia geográfica al considerar todas las localidades (A) y al considerar únicamente las del Atlántico (B) para los genes CitB tipo F, CitB tipo M y COI

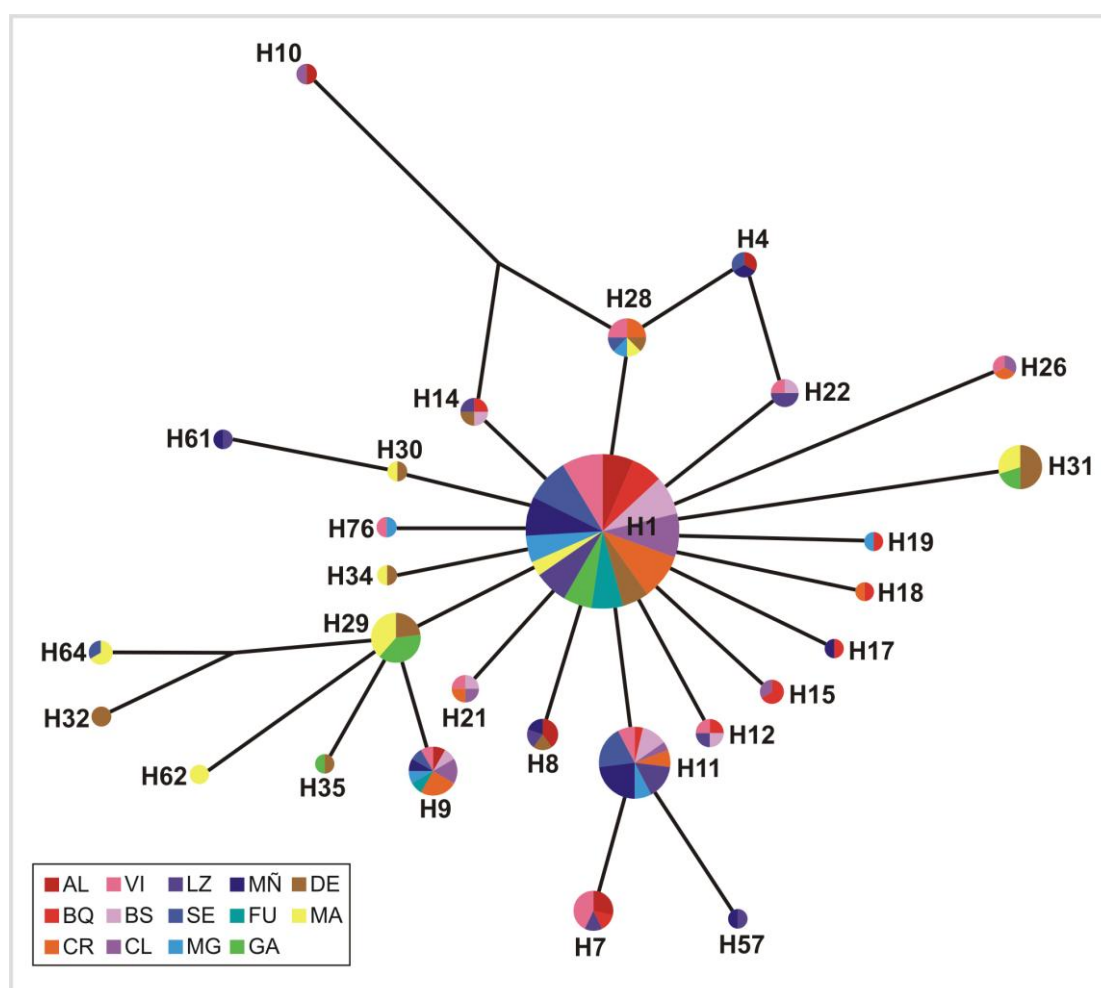


Figura 4.7. Red de haplotipos obtenida para el gen CitB tipo F. Las localidades se representan con colores y los sectores de los gráficos son proporcionales a la frecuencia del haplotipo en cada localidad. Los haplotipos únicos no están representados

4.3.5. Análisis demográfico

Las redes de haplotipos construidas para cada uno de los genes incluyendo únicamente los haplotipos compartidos muestran en los tres casos una estructura estrellada, característica de los procesos de expansión poblacional. En el caso del CitB tipo F (Figura 4.7), la red está centrada en el haplotipo H1, el haplotipo más frecuente y presente en las catorce localidades estudiadas. Además, puede distinguirse otra estructura en estrella menos definida y centrada en el haplotipo H29, presente únicamente en las localidades del grupo Mediterráneo. En el CitB tipo M (Figura 4.8) la red está centrada en el haplotipo H1, existente en todas las localidades excepto en DE y MA. Asimismo, destaca la existencia de dos haplotipos, H17 y H19, separados del núcleo central y presentes solamente en tres y dos localidades, respectivamente, del grupo Mediterráneo. Por último, en el caso del COI (Figura 4.9) la red está centrada en el haplotipo H2, presente en todas las localidades. Además, se

puede observar la existencia de otras dos estructuras en estrella menos definidas: una centrada en el haplotipo H40, presente en las localidades del Mediterráneo y otro centrado en H3, existente en todas las localidades excepto MÑ y MA.

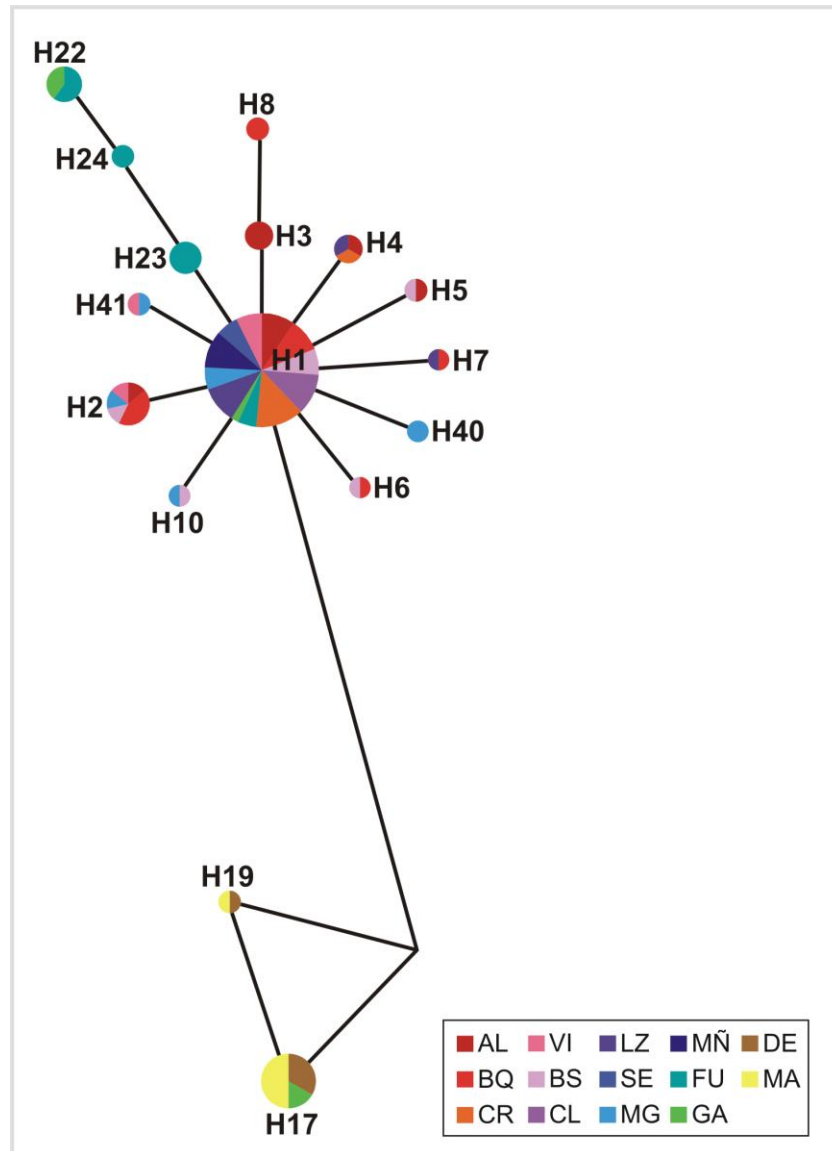
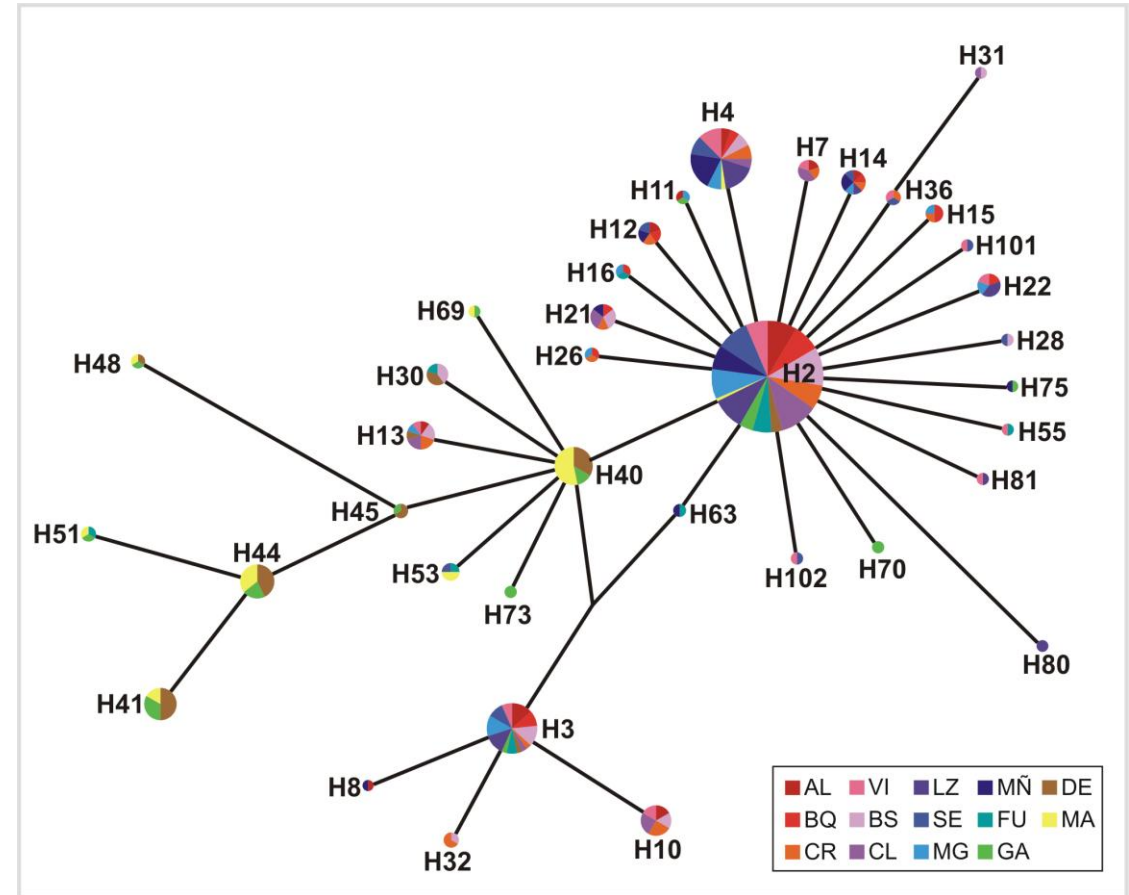


Figura 4.8. Red de haplotipos obtenida para el gen CitB tipo M. Las localidades se representan con colores y los sectores de los gráficos son proporcionales a la frecuencia del haplotipo en cada localidad. Los haplotipos únicos no están representados



Respecto al análisis de *mismatches*, ambos grupos mostraron una distribución

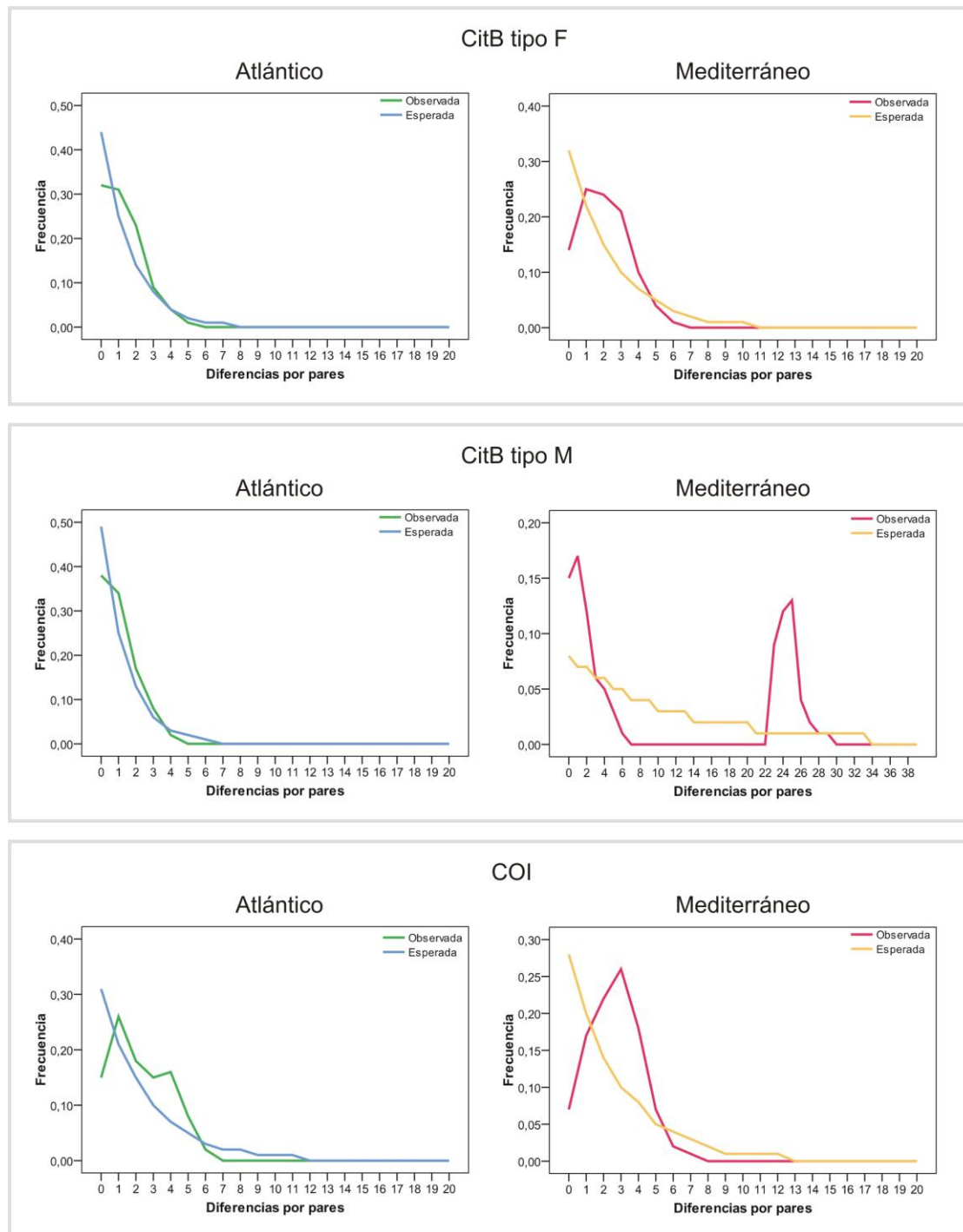


Figura 4.10. Distribución de *mismatches* para los genes CitB tipo F, CitB tipo M y COI en las regiones del Atlántico y del Mediterráneo

Los resultados de las distribuciones de *mismatches* están en consonancia con los valores observados en los estadísticos F_s de Fu, D de Tajima y R_2 de Ramos-Onsis (Tabla 4.7). El grupo Atlántico mostró valores negativos y significativos en los estadísticos F_s de Fu y D de Tajima, así como, valores significativos del estadístico R_2 de Ramos-Onsis, lo que sugiere un proceso de expansión poblacional en esta región. En el grupo Mediterráneo los test de neutralidad también fueron significativos en todos

los casos, excepto en el gen CitB tipo M en el que los tres estadísticos no mostraron valores significativos.

Tabla 4.7. Test de neutralidad para las dos regiones geográficas inferidas

	Grupo	F_s de F_u	P -valor	D de Tajima	P -valor	R_2	P -valor
CitB tipo F	Mediterráneo	-38,822	<0,001	-2,303	<0,001	0,025	<0,001
	Atlántico	-97,723	<0,001	-2,468	<0,001	0,012	0,002
CitB tipo M	Mediterráneo	-0,736	0,410	0,308	0,681	0,135	0,738
	Atlántico	-53,182	<0,001	-2,400	<0,001	0,017	0,003
COI	Mediterráneo	-31,814	<0,001	-2,002	0,002	0,035	0,008
	Atlántico	-126,979	<0,001	-2,333	<0,001	0,016	0,002

4.4. DISCUSIÓN

En este trabajo se emplean por primera vez marcadores mitocondriales para analizar la diversidad genética y la estructura poblacional de *D. trunculus* a lo largo de la Península Ibérica.

El gen CitB se amplificó de manera exitosa en ambos tipos de ADNmt (tipos F y M) empleando los cebadores específicos diseñados por Theologidis y col. (2008). Sin embargo, en el caso del gen COI no pudo detectarse la presencia de los dos tipos. Para esta región no existen en la bibliografía cebadores específicos de linaje mitocondrial y las secuencias obtenidas en las amplificaciones iniciales con cebadores diseñados en este trabajo no mostraron diferencias asociables al sexo y al tejido. Por tanto, las amplificaciones se realizaron a partir de ADN de tejido somático y las secuencias corresponden presumiblemente al tipo F. En la práctica, la detección y amplificación de ambos tipos mitocondriales puede resultar compleja por diferentes razones. En ocasiones, el genoma F puede interferir con la amplificación del genoma M en extracciones de ADN a partir de gónada masculina, que frecuentemente están contaminadas con células somáticas (Zouros, 2013). Además, es posible que en algunos machos el genoma paterno se encuentre en una baja proporción (Ladoukakis y col., 2002). En ambas situaciones, si los cebadores empleados se unen preferentemente a uno de los tipos el otro no será detectado. Sin embargo, en este trabajo, parece poco probable que tanto la contaminación durante la disección de los tejidos y la extracción de ADN como la baja proporción del genoma M hayan tenido un efecto relevante, ya que, en el caso del gen CitB se han amplificado satisfactoriamente los dos tipos. Las secuencias nucleotídicas de ambos tipos son otro factor importante para su detección. Así, puede suceder que las diferencias existentes entre ambos tipos sean tan pequeñas que dificulten su identificación. Esta homogeneidad entre las secuencias puede ser debida a la existencia de recombinación del ADNmt, un fenómeno descrito en los mejillones *M. galloprovincialis* (Ladoukakis y Zouros, 2001) y *M. trossulus* (Burzynski y col., 2003). Por el contrario, si las secuencias del gen en los dos tipos de ADNmt son altamente divergentes, los cebadores que reconocen y amplifican la secuencia en uno de los tipos pueden fallar en el otro (Theologidis y col., 2008). En algunas especies se han detectado niveles elevados de divergencia entre ambos tipos (~10 – 30%), lo que podría complicar su detección y amplificación (Passamonti y col., 2003).

Los dos genes analizados en este trabajo resultaron polimórficos en todas las localidades estudiadas, mostrando valores globales de diversidad haplotípica similares aunque ligeramente superiores en el gen COI (CitB tipo F=0,736; CitB tipo M=0,722; COI=0,892). En el caso de la diversidad nucleotídica, tanto el CitB tipo F como el COI presentaron valores considerablemente inferiores a los observados en el CitB tipo M (CitB tipo F=0,0046; Citb tipo M=0,0195; COI=0,0062). En el caso del CitB los valores globales de diversidad haplotípica en los tipos F (0,736) y M (0,722) obtenidos para la coquina *D. trunculus* son del orden de los observados para este mismo gen en las almejas *Artica islandica* (0,687; Dahlgren y col., 2000) y *Venerupis pullastra* (0,620; Pereira, 2013) y en el berberecho *Cerastoderma edule* (0,799: Martínez y col., 2015), especies en las que no se ha descrito DUI. Dada la ausencia, hasta la fecha, de estudios de diversidad en el gen CitB en especies con DUI no es posible comparar los valores obtenidos en el tipo M con los observados para este linaje mitocondrial en otras especies.

En este trabajo, los valores de diversidad haplotípica observados para los tipos F y M de CitB son similares entre sí. Esta similitud entre ambos tipos ha sido observada previamente en otros genes mitocondriales en diferentes especies de mejillón (Ort y Pogson, 2007; Śmietanka y col., 2013). Con respecto a la diversidad nucleotídica, el valor global obtenido en el tipo F (0,0046) es similar al observado en *V. pullastra* (0,004; Pereira, 2013), pero ligeramente inferior al de *C. edule* (0,0071; Martínez y col., 2015). Respecto al valor observado para el tipo M en este trabajo (0,0195), este resultó cuatro veces mayor que el obtenido en el tipo F. Este resultado concuerda con los obtenidos en estudios previos realizados en bivalvos en los cuales detectan valores de diversidad nucleotídica superiores, en algunos casos entre dos y cuatro veces, en el tipo M respecto al F al analizar diferentes regiones mitocondriales (Hoeh y col., 1996; Passamonti y Scali, 2001; Passamonti y col., 2003; Ort y Pogson, 2007; Śmietanka y col., 2013). La existencia de un mayor nivel de polimorfismo así como una mayor tasa de evolución en el genoma M frente al F ha sido señalada en estudios previos con mejillón (Skibinski y col., 1994b; Rawson y Hilbish, 1995; Stewart y col., 1995). Se han planteado diferentes mecanismos que podrían contribuir a este patrón. Algunos autores han propuesto que el genoma M podría experimentar una elevada tasa de mutación debido al mayor número de divisiones celulares que ocurren durante la espermiogénesis frente a la ovogénesis (Rawson y Hilbish, 1995; Stewart y col., 1995). Este incremento en la tasa de mutación podría contribuir a un mayor nivel de polimorfismo. Además, se ha propuesto que el genoma M experimenta una relajación de la presión selectiva. Dado que el genoma M sólo está presente en el tejido gonadal

masculino, la presión selectiva sería más relajada que en el genoma F, lo que permitiría una mayor tasa de sustitución nucleotídica (Skibinski y col., 1994b; Rawson y Hilbish, 1995; Stewart y col., 1995; Stewart y col., 1996).

Las distancias sinónima (K_S) y no sinónima (K_A) observadas en este trabajo, 1,233 y 0,311, respectivamente, fueron ligeramente inferiores a las descritas previamente por Theologidis y col. (2008) ($K_S=1,998$; $K_A=0,278$) para este mismo gen en *D. trunculus*. Sin embargo, estos valores fueron superiores a los observados para este gen en *M. galloprovincialis* ($K_S=0,736$; $K_A=0,085$) (Mizi y col., 2005). El bajo valor de K_A frente a K_S sugiere la existencia de selección purificadora en el CitB. Asimismo, los resultados obtenidos con el test D de Tajima apoyan la ausencia de evolución neutral en estos genomas. En el caso del genoma F los valores negativos de este test, y significativos en la mayor parte de las localidades, sugieren que este tipo mitocondrial está sometido a la acción de la selección negativa o purificadora. Mientras que en el caso del tipo M, los valores obtenidos son mayores y en muy pocos casos significativos, indicando que en este genoma las fuerzas selectivas están más relajadas. Un reciente incremento del tamaño efectivo de la población puede contribuir a la existencia de valores negativos. Sin embargo, esto no podría explicar las diferencias observadas entre los dos genomas puesto que ambos han experimentado la misma historia demográfica. Esta situación ha sido observada previamente en otras especies de mejillón como *M. californianus* (Ort y Pogson, 2007) o *M. trossulus* (Śmietanka y col., 2013). El test de McDonald y Kreitman mostró un ratio P/F significativamente menor en las sustituciones no sinónimas que en las sinónimas, lo que sugiere un exceso de evolución aminoacídica entre ambos genomas. Este exceso podría ser debido a la acción de la selección positiva o equilibradora (Rand y Kann, 1996). El elevado número de sustituciones no sinónimas fijadas entre ambos linajes resulta contradictorio respecto a los resultados obtenidos con el test de D de Tajima. Esta discrepancia podría estar relacionada con la elevada divergencia de secuencia entre linajes (un 35,85% de los aminoácidos son distintos), que puede conducir a una subestimación del número de sustituciones sinónimas fijadas (Ort y Pogson, 2007). Además, la existencia de fluctuaciones en el tamaño efectivo poblacional (cuellos de botella y procesos de expansión poblacional) pueden contribuir a la obtención de valores significativos en el test de McDonald y Kreitman (Ort y Pogson, 2007).

El gen COI también reveló una diversidad genética considerable en *D. trunculus*, con un valor global de diversidad haplotípica elevado (0,892). Este valor fue similar al observado en la especie congénica *D. obesulus* (0,910) en un estudio realizado a lo

largo de la costa oeste de Chile y Perú (Carstensen y col., 2009). Sin embargo, el valor obtenido en *D. trunculus* fue muy superior al observado para otra especie congénérica, *D. serra* (0,300), a lo largo de la costa sur africana (Bezuidenhout y col., 2014). El valor global de diversidad nucleotídica obtenido en este trabajo fue bajo (0,0062), pero superior al observado en *D. serra* (0,00103; Bezuidenhout y col., 2014) y *D. obesulus* (0,00409; Carstensen y col., 2009). Respecto a las estimas de diversidad proporcionadas para este mismo gen en otras especies de bivalvos con DUI, los valores obtenidos en este trabajo son inferiores a los observados para el tipo F del mejillón *Perumytilus purpuratus* ($Hd=0,970$ y $\pi=0,0090$; Vargas y col., 2015) y ligeramente superiores a los descritos para este tipo mitocondrial en otra especie de mejillón, *M. californianus* ($Hd=0,861$ y $\pi=0,0042$; Ort y Pogson, 2007). Asimismo, las estimas obtenidas para *D. trunculus*, correspondientes presumiblemente al tipo F, son inferiores a las observadas para el tipo M de este gen tanto en *P. purpuratus* ($Hd=1,000$ y $\pi=0,0100$) como en *M. californianus* ($Hd=0,987$ y $\pi=0,0101$). Estas diferencias de diversidad respecto al COI tipo M de ambas especies de mejillón concuerdan con el mayor polimorfismo de este linaje mitocondrial frente al tipo F observado en otros moluscos bivalvos y comentado anteriormente.

Los análisis realizados con los marcadores mitocondriales CitB y COI, incluyendo tanto las estimas de F_{st} globales y por pares de localidades como la distribución geográfica de los haplotipos, indican la existencia de estructura genética significativa en *D. trunculus* en la Península Ibérica. Estos marcadores indicaron la existencia de dos grupos de poblaciones, el grupo Mediterráneo, que comprende las localidades situadas en el Mar Mediterráneo (GA, DE y MA), y el grupo Atlántico que incluye a todas las localidades situadas en la costa del Océano Atlántico y a la localidad FU, localizada en la costa del Mar de Alborán, la parte más occidental del Mar Mediterráneo. El patrón de diferenciación observado podría relacionarse tanto con el aislamiento geográfico, de forma que la existencia de barreras físicas u oceanográficas restringe el flujo génico entre poblaciones, como con el aislamiento por distancia. A pesar de que el flujo génico opera a grandes distancias podría alcanzarse un nivel en donde el intercambio de migrantes no es lo suficientemente fuerte como para contrarrestar los efectos de la deriva genética (Lind y col., 2007). Dada la dificultad de diferenciar entre ambas posibilidades, Bossart y Prowell (1998) recomiendan estudiar la correlación entre distancias geográficas y genéticas del conjunto de poblaciones y de poblaciones por separado para evaluar si determinadas poblaciones son responsables del aislamiento por distancia. Así, cuando los valores significativos de la correlación están asociados a determinadas poblaciones o a grupos de ellas, el

aislamiento geográfico sería la explicación más plausible, mientras que si la significación está dispersa a través de los pares de poblaciones, se apoyaría el aislamiento por distancia. Los tests de Mantel realizados en este trabajo revelaron la existencia de una correlación significativa entre las estimas F_{st} por pares y la distancia geográfica al comparar todas las localidades. A pesar de que el test resultó significativo en los tres casos (CitB tipo F, CitB tipo M y COI) las representaciones gráficas se ajustaron de forma pobre al modelo lineal, ya que a partir de una cierta distancia geográfica, la distancia genética aumentó de forma mucho más rápida, obteniéndose un patrón más consistente con un modelo exponencial que lineal. Al utilizar únicamente el grupo de localidades del Atlántico sólo se encontraron valores significativos en el caso del CitB tipo M para un $\alpha=0,05$. La pérdida de significación al eliminar las localidades del grupo Mediterráneo podría ser indicativo de que la correlación entre la distancia genética y geográfica observada con el conjunto de localidades se deba probablemente a un artefacto provocado por la fuerte diferenciación con las muestras del Mediterráneo. En el caso de existir una relación real entre ambas medidas, el test de Mantel debería seguir mostrando una correlación significativa al analizar únicamente las localidades del grupo Atlántico.

La estructura genética observada en este trabajo podría asociarse con la existencia de un aislamiento geográfico promovido por el frente Almería – Orán, una barrera oceanográfica que delimita el extremo oriental del mar de Alborán. Esta disrupción genética en el sureste de la Península Ibérica fue observada empleando diferentes marcadores moleculares (ADN mitocondrial, alozimas o microsatélites) en diferentes especies de bivalvos como el mejillón (Sanjuan y col., 1994, 1996, 1997; Quesada y col., 1995a, 1995b; Šmietanka y col., 2004; Diz y Presa, 2008; Luis y col., 2011) o la vieira (Ríos y col., 2002), así como en otros organismos marinos tales como crustáceos (Zane y col., 2000), cefalópodos (Pérez-Losada y col., 2002) o peces (Naciri y col., 1999; Ramón y Castro, 1997). El Mar de Alborán, situado al oeste del Mar Mediterráneo, limita con el Océano Atlántico por el Estrecho de Gibraltar. Esta región constituye una zona de transición entre dos cuencas con características oceanográficas diferentes, donde coexisten especies atlánticas y mediterráneas. El frente Almería – Orán es una zona de fuertes corrientes en la que se dan cambios bruscos en la temperatura del agua y en su salinidad (Tintore y col., 1988). Esta área constituye una barrera oceanográfica para la dispersión de larvas planctónicas y, por tanto, puede impedir el flujo génico entre las poblaciones atlánticas y mediterráneas, que viven adaptadas a ambientes con características oceanográficas diferentes, contribuyendo de esta manera a su diferenciación. Muchos procesos oceanográficos

son estacionales, de forma que estos podrían afectar al flujo génico de las especies de manera diferente en función de su estación reproductiva o de la capacidad de dispersión larvaria (Salat, 1996; García-Merchán y col., 2012). La coquina *D. trunculus* presenta un período de madurez sexual durante la primavera y el verano (Gaspar y col., 1999), coincidiendo con la época de mayor intensidad de la barrera Almería – Orán. La intensidad de este frente durante la etapa de desarrollo larvario de la coquina podría restringir la conectividad genética de poblaciones a ambos lados de la barrera, contribuyendo a la diferenciación genética observada.

De forma rutinaria los estudios que analizan la diversidad y diferenciación genético – poblacional emplean un único marcador molecular. Sin embargo, el empleo de marcadores con tasas de mutación y patrones de herencia distintos ha demostrado ser muy útil para distinguir procesos contemporáneos e históricos que afectan a la estructura de la población. De hecho, existen cada vez más trabajos que comparan los datos obtenidos con marcadores microsatélite y de ADNmt en las mismas muestras (Tessier y col., 1997; Hansen y col., 1999; Huvet y col., 2000; Daemen y col., 2001; Hoffman y col., 2009; Borrell y col., 2012; Harris y col., 2013; DeBoer y col., 2014; Martínez y col., 2015). En este trabajo, los patrones de diferenciación observados con los marcadores CytB y COI resultaron similares a los obtenidos con microsatélites (Capítulo 3). Sin embargo, los marcadores mitocondriales no detectaron diferenciación genética en la localidad FU, que se agrupó con las localidades del Atlántico, mientras que en el análisis *Fst* por pares con *loci* microsatélite esta localidad presentó diferencias significativas respecto a todas las localidades. Aunque existen trabajos en los que los datos obtenidos con ambos marcadores son congruentes (Tessier y col., 1997; DeBoer y col., 2014), la existencia de diferencias en los patrones de diferenciación detectados con cada uno de los marcadores también es común en este tipo de estudios (Hansen y col., 1999; Glynn y col., 2015). En general se acepta que los marcadores microsatélite son especialmente adecuados para proporcionar información sobre eventos evolutivos recientes y contemporáneos (Chistiakov y col., 2006) mientras que el ADNmt es particularmente apto para captar procesos evolutivos históricos (Wang, 2010b). Esto podría relacionarse con mayor tasa de mutación de los microsatélites frente al ADNmt (Frankham y col., 2002). Por otro lado, el menor tamaño efectivo del ADNmt frente a los marcadores nucleares hace que sufra mayores niveles de deriva genética (Ferguson y col., 1995; Ballard y Whitlock, 2004). Esto sugeriría que los marcadores mitocondriales tienen mayor poder para detectar procesos de divergencia poblacional reciente (Karl y col., 2012). Sin embargo, la detección de diferenciación genética depende de la interacción de un complejo grupo

de factores entre los que se incluyen, además de la tasa de mutación y el tamaño efectivo poblacional, los niveles de diversidad genética de los marcadores, la migración o la dispersión diferencial de sexos (Karl y col., 2012).

En el análisis con marcadores mitocondriales, las localidades del Atlántico (AL, BQ, CR, VI, BS, CL, LZ, SE, MG y MÑ) así como FU resultaron, en general, genéticamente homogéneas puesto que no se han detectado diferencias significativas entre estas localidades y la distribución de haplotipos entre ellas resultó similar tanto en los dos tipos de CitB como en COI. La homogeneidad genética de las localidades atlánticas detectada en este estudio concuerda con los resultados previos de otras especies marinas que habitan en la costa Atlántica europea (Duran y col., 2004; Couceiro y col., 2007). Las características oceanográficas de la costa Atlántica, entre las que destaca una gran mezcla de masas de agua (Bowden, 1975) favorecen el intercambio larvario, evitando la diferenciación entre las poblaciones de la costa Atlántica de la Península Ibérica. Además, esta homogeneidad se extiende hasta la localidad FU, localizada en el Mar de Alborán, donde las condiciones ecológicas son más características del océano Atlántico que del Mar Mediterráneo (Estrada y col., 1985). Asimismo, la ausencia de estructuración genética en este grupo de localidades podría estar relacionada con la existencia de un proceso de expansión poblacional reciente. Tanto las redes de haplotipos como la distribución unimodal de *mismatches* y los resultados significativos obtenidos en los tests de neutralidad realizados tanto con CitB como con COI sugieren la existencia de un proceso de expansión.

El conjunto de poblaciones del grupo Mediterráneo (GA, DE y MA) muestran también homogeneidad entre sí, principalmente entre DE y MA. Los test de neutralidad y la distribución de *mismatches* en los genes CitB tipo F y COI sugirieron también la existencia de procesos de expansión poblacional. Sin embargo, en el Citb tipo M los test de neutralidad no resultaron significativos y la distribución de *mismatches* es multimodal, lo que indicaría la existencia de un tamaño poblacional constante durante un largo período de tiempo. No obstante, se ha observado que poblaciones en las que existe un cierto grado de subdivisión muestran distribuciones de *mismatches* multimodales aunque hayan experimentado una expansión reciente (Marjoram y Donnelly, 1994; Bertorelle y Slatkin, 1995; Ray y col., 2003). En el caso de las tres localidades incluidas en el grupo Mediterráneo, el análisis AMOVA con el CitB tipo M reveló la existencia de diferenciación significativa entre las poblaciones dentro de grupo ($F_{sc}=0,445$) y los F_{st} por pares mostraron diferenciación significativa tras Bonferroni entre las localidades GA y DE. Por tanto, la detección de subdivisión

poblacional únicamente con el gen CitB tipo M podría deberse a características propias de este fragmento (como mayor polimorfismo y posiblemente mayor tasa de mutación) y explicar las diferencias observadas en los análisis demográficos con el CitB tipo F y el COI.

Análisis de paternidad en *Donax trunculus* empleando marcadores microsatélite



5.1. INTRODUCCIÓN

El principal objetivo genético del cultivo en criadero es conservar, en la mayor medida posible, la diversidad genética de la población natural originaria (Frankham y col., 2002). Sin embargo, las prácticas de cultivo se asocian, en ocasiones, con fenómenos como la deriva genética, la selección o un incremento en la tasa de endogamia, que pueden tener consecuencias negativas en la diversidad genética de la semilla producida, y provocar así cambios significativos en la población natural (Ward, 2006). Con el fin de evitar los efectos deletéreos en los bancos naturales sometidos a repoblación, Gaffney (2006) propone tener en cuenta tres consideraciones principales: (1) identificar los reproductores genéticamente adecuados para la población que se desea repoblar, (2) conservar la máxima variabilidad genética y reducir la endogamia en los reproductores de criadero y (3) mantener el tamaño efectivo de la población natural.

Los programas de repoblación deben tener en cuenta la estructura genética de la especie, ya que la introducción de genotipos poco representativos de la población natural puede tener efectos negativos. Por ello, los individuos utilizados como reproductores en el criadero deben proceder preferentemente de la población a repoblar y en su defecto, de una genéticamente similar (Ward, 2006). A pesar de la elevada fecundidad que presentan muchas especies de moluscos bivalvos, el número de reproductores empleado en el criadero debe ser elevado para evitar que en los bancos naturales se acumulen genotipos estrechamente relacionados (Ward, 2006). Además, de esta forma se evita la pérdida de diversidad que la deriva genética y la selección en criadero producen en lotes de reproductores de pequeño tamaño (Gaffney, 2006).

Muchas especies acuícolas presentan una elevada fecundidad, por lo que una práctica común en criadero es la obtención de un gran número de descendientes a partir de un limitado número de progenitores (Boudry y col., 2002). Dado que la variabilidad genética de la descendencia está relacionada en general con el número de progenitores, estas prácticas de criadero afectarán negativamente a la diversidad genética. Sin embargo, aunque se emplee un elevado número de progenitores, la diversidad genética también puede verse reducida por un desequilibrio en la contribución parental (Hedgecock y Sly, 1990). Este desequilibrio es preocupante en los programas de repoblación que incluyen un desove masivo (Boudry y col., 2002). Además, el desequilibrio en la proporción de sexos también puede provocar cambios

genéticos en la descendencia, ya que una proporción de sexos desigual conduce a una reducción del tamaño efectivo (Frankham y col., 2002).

El tamaño efectivo de población es otro parámetro importante a tener en cuenta. Un valor bajo de este en el lote de reproductores promueve la pérdida de variación genética en la semilla en comparación con la población natural de la que provienen los reproductores (Bartley y col., 1995; Ryman y Laikre, 1991). Además de una reducción en la diversidad genética, el cultivo en criadero puede causar una mayor tasa de endogamia. Esta reduce la eficacia biológica mediante depresión endogámica, afectando negativamente a diferentes aspectos relacionados con la reproducción (número de descendientes, supervivencia juvenil, longevidad, cantidad y calidad del esperma o habilidad materna, entre otros) (Frankham y col., 2002). La depresión endogámica está relacionada con un incremento en la homocigosidad de alelos deletéreos recesivos. Estos alelos están presentes en los genomas de todas las especies ya que son continuamente introducidos por medio de la mutación, y la selección natural es incapaz de eliminarlos debido a que muchas copias de estos alelos están ocultas fenotípicamente en los heterocigotos, que no presentan una eficacia biológica reducida (Allendorf y col., 2013).

Otro factor a considerar es la selección natural ya que puede afectar a la composición genética de la semilla. La selección que ocurre en el criadero promueve la adaptación de los individuos a las condiciones de cautividad, por lo que, de forma inevitable estos cambios disminuyen la adaptabilidad de los individuos del criadero a las condiciones naturales (Allendorf y col., 2013). Además, la semilla producida también pueden tener un importante efecto genético en la población natural debido a que alelos que son poco eficaces en el medio natural podrían resultar ventajosos en cautividad, pudiendo incrementar su frecuencia e incluso fijarse en las poblaciones de criadero (Lynch y O'Hely, 2001).

Los análisis de paternidad juegan un papel importante en acuicultura ya que proporcionan información relevante para el mantenimiento de la diversidad genética y la prevención de endogamia en la semilla producida en criadero. El estudio de paternidades mediante el empleo de marcadores moleculares combinado con métodos estadísticos se basa en conocer el grado de similitud genética existente entre individuos para asignar los padres a un individuo o grupo de individuos. El método más empleado es el de la asignación categórica, que utiliza principalmente enfoques basados en verosimilitud para seleccionar el padre más probable en un grupo de

progenitores potenciales (Jones y col., 2010). El progenitor más verosímil se obtiene mediante el logaritmo de la razón de probabilidades (*LOD score*) de que un individuo sea el padre del descendiente problema respecto de que lo sea uno tomado al azar de la población de referencia. Esta probabilidad dependerá de la similitud genética entre el presunto padre y el descendiente analizado, medida en función del número de alelos que compartan. La identificación de cada uno de los progenitores mediante los análisis de paternidad permite cuantificar la contribución de los mismos a la semilla, así como conocer el sistema real de apareamiento. Esto combinado con un conocimiento previo del sexo de los progenitores permite evaluar la existencia de sesgos en la proporción de sexos y, en consecuencia, la relación entre el tamaño efectivo del lote de progenitores y el tamaño censal. El estudio de estos aspectos es esencial para estimar una posible pérdida de diversidad y un incremento de endogamia, así como, para determinar las posibles causas y proponer patrones de manejo que minimicen los posibles efectos negativos del cultivo en criadero.

La naturaleza altamente variable de los *loci* microsatélite hace que estos marcadores moleculares sean particularmente adecuados para los análisis de paternidad y el estudio de las relaciones de parentesco (O'Connell y Wright, 1997; DeWoody, 2005). Además, constituyen una herramienta muy útil para la evaluación de la variación en el éxito reproductivo de los individuos (Boudry y col., 2002; Hedgecock y col., 2007; Lallias y col., 2010b), la cual podría estar relacionada en parte con diferencias en la eficacia biológica, un parámetro clave para la mejora de los bancos naturales mediante la repoblación con semilla obtenida en criadero. Los marcadores microsatélite han sido ampliamente utilizados para los análisis de paternidad de diferentes especies de moluscos bivalvos como almejas (Lu y col., 2011; Borrell y col., 2014; Dai y col., 2014), mejillones (Pino-Querido y col., 2014), ostras (Boudry y col., 2002; Hedgecock y col., 2007; Li y col., 2009; Lind y col., 2009; Lallias y col., 2010b; Li y col., 2010) o vieiras (Morvezen y col., 2013). Sin embargo, a pesar de la importancia de llevar a cabo análisis de paternidad en criadero y de que *D. trunculus* constituye un importante recurso para el sector marisquero de Galicia, donde se encuentra sobreexplotado, todavía no se han realizado este tipo de estudios en esta especie.

En este capítulo se lleva a cabo un análisis de paternidad con marcadores microsatélite en la coquina *D. trunculus* y se evaluaron los cambios genéticos producidos durante el proceso de obtención de semilla en criadero.

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1. Material de estudio y extracción de ADN

Se utilizó un lote de 364 reproductores recogido en la localidad de Vilarrube y semilla obtenida por desove masivo en el criadero del Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo. Los reproductores obtenidos del medio natural se mantuvieron en el criadero durante un período de quince días, momento en el que tuvo lugar un desove espontáneo. La semilla obtenida se mantuvo creciendo en el criadero y una vez alcanzada una talla mínima (1500 – 2000 μm), se trasladó a la batea para su preengorde. La semilla analizada en este trabajo se dividió en 4 grupos diferentes en función del tiempo que se mantuvo creciendo en el criadero y en función de si fue sometida a preengorde en una batea en la Ría de Arousa o no (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Características de los grupos de semilla

Grupo de semilla	Número de individuos	Tamaño (μm)	Tiempo de crecimiento en criadero	Tiempo de preengorde en batea
T1	400	> 1000	~2 meses y medio	-
T2	100	> 1500	~3 meses y medio	-
T3	100	> 1500	~5 meses	-
T4	99	3900 – 5900	~2 meses y medio	~5 meses y medio

Una vez en el laboratorio, los reproductores utilizados en el criadero se sexaron mediante observación al microscopio de tejido gonadal y se diseccionaron guardando de cada uno el pie y la masa visceral en etanol al 96% para su conservación. La semilla se mantuvo en etanol 96% de forma individualizada; en el caso de la procedente del preengorde en batea, de mayor tamaño, los individuos se almacenaron con las valvas abiertas para permitir que el etanol impregnase los tejidos y favorecer su conservación.

Para cada individuo reproductor y cada ejemplar de semilla sometido a preengorde, la extracción de ADN se realizó a partir de un fragmento de pie siguiendo el protocolo descrito por Walsh y col. (1991). Para la semilla de menor tamaño se fragmentó previamente todo el individuo con ayuda de unas pinzas y luego se empleó el mismo protocolo de extracción. La cuantificación del ADN extraído se realizó en un espectrofotómetro nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.).

5.2.2. Rediseño y optimización de PCRs multiplex

Con el objetivo de reducir el número de amplificaciones, para genotipar el conjunto de reproductores y semilla se rediseñaron las PCRs *multiplex* previamente optimizadas (ver Capítulo 2). Para la selección de los *loci* microsatélite se consideraron los resultados de diversidad genética obtenidos en el proceso de optimización de las PCRs *multiplex* (Capítulo 2), así como la facilidad para genotipar los alelos y los fluorocromos utilizados en el marcaje de los cebadores. La optimización y amplificación de las PCRs *multiplex* se llevó a cabo como se describe en el Capítulo 2.

5.2.3. Análisis de relaciones genéticas entre individuos

5.2.3.1. Asignación de paternidad

La asignación de paternidad se realizó empleando el método de máxima verosimilitud implementado en el programa Cervus v3.0.3 (Kalinowski y col., 2007). Este programa está diseñado para el análisis de datos de marcadores codominantes, autosómicos y que segregan de forma independiente. Además, asume que la especie objeto de estudio es diploide.

Inicialmente, para valorar la idoneidad de los *loci* de cara a posteriores análisis se estimaron con el programa Cervus las frecuencias alélicas, así como varios parámetros para cada *locus*: número de individuos genotipados, número de homocigotos y heterocigotos, número de alelos, heterocigosidad observada y esperada, ajuste al equilibrio HW y contenido en información polimórfica (PIC). El cálculo del PIC para cada *locus* se realizó según Botstein y col., (1980):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

Donde p_i y p_j son las frecuencias de los alelos i y j , respectivamente, y n es el número de individuos de la población.

Además, este programa también calcula el potencial de exclusión por *locus* y global, que corresponde a la probabilidad de excluir a un falso progenitor de un descendiente dado cuando sólo se conoce el genotipo del descendiente (Exclusión 1) o conociendo

también el genotipo de uno de los parentales (Exclusión 2). El potencial de exclusión 1, para un *locus* l con k alelos se calculó según:

$$P_l = a_l - 4a_2 + 4a_3 - 3a_4 + 2a_2^2$$

Donde $a_n = \sum_{i=1}^k p_i^n$.

El potencial de exclusión 2, para un *locus* l con k alelos se calculó según:

$$P_l = a_l - 2a_2 + a_3 + 3(a_2a_3 - a_5) - 2(a_2^2 + a_4)$$

La probabilidad media global de exclusión para n *loci* no ligados se calculó según:

$$P = 1 - \prod_{l=1}^n (1 - p_l)$$

La frecuencia de alelos nulos en el lote de reproductores se estimó según el método de Brookfield I (Brookfield, 1996) empleando el programa MicroChecker (Van Oosterhout y col., 2004).

A continuación, con el programa Cervus se simuló un análisis de paternidad para estimar el poder de resolución de los marcadores empleados y los valores críticos de los estadísticos LOD o Delta, de forma que se pueda evaluar la fiabilidad de la asignación realizada. El valor LOD se obtiene a partir del logaritmo neperiano de la tasa global de verosimilitud de la asignación (verosimilitud de un individuo de ser un progenitor relativa a la que tiene un individuo escogido al azar). Un valor LOD negativo indica que la pareja candidata tiene menos probabilidad de ser los verdaderos padres que de no serlo, mientras que un valor positivo indica que la pareja candidata tiene mayor probabilidad de ser los padres reales que de no serlo. Por otro lado, el estadístico Delta se obtiene a partir de la diferencia entre los valores LOD de la primera y segunda parejas más probables. El programa permite seleccionar dos niveles de confianza para la asignación de paternidad: relajado y estricto (normalmente 80 y 95%). Para llevar a cabo la simulación el programa genera, asumiendo la existencia de equilibrio HW, genotipos paternos y maternos a partir de las frecuencias alélicas observadas en los individuos objeto de estudio, y genotipos de

descendientes mediante un muestreo mendeliano de los alelos parentales. Además, dicho programa también genera de forma aleatoria genotipos de progenitores no relacionados. Los parámetros definidos en este estudio para la simulación fueron: 10 000 descendientes, 364 reproductores (194 padres y 170 madres), 100% de los padres candidato muestreados y genotipados y un 1% de tasa de error de genotipado.

Finalmente, se realizó el análisis real de paternidad del mismo modo que el análisis simulado después de indicar los padres y madres candidatos y la descendencia. El padre/madre/pareja candidato más probable corresponde al de mayor puntuación LOD. La confianza en la asignación del padre/madre/pareja más probable se evalúa en función del valor crítico de LOD o Delta determinado en la simulación.

Una vez realizado el análisis de paternidad, se evaluó la proporción de sexos tanto en el lote de reproductores empleado como en los progenitores identificados mediante un test binomial con el paquete SPSS 15.0.

5.2.3.2. Análisis de la contribución de los progenitores a la semilla

Con el objetivo de evaluar dentro de cada sexo si la contribución a la semilla fue similar, tanto para el total de la semilla como dentro de grupos, se realizó un test χ^2 con la función `chisq.test` del programa R (R Core Team, 2014). El *p*-valor se calculó mediante simulación Monte Carlo (100 000 réplicas).

Además, se analizó la existencia de contribución desigual de los progenitores, divididos por sexo, a cada uno de los grupos de tamaño. Para llevar a cabo este análisis se empleó un método de remuestreo descrito en Borrell y col. (2011). Se generaron 100 000 tablas de contingencia de forma pseudoaleatoria para machos y hembras con la función `r2dtable` del programa R (R Core Team, 2014), en las cuales los totales por fila y columna corresponden al número de descendientes observado. La proporción de tablas en las que el valor obtenido, para un progenitor y grupo de semilla, es mayor o igual al observado indica cuan probable es obtener dicho valor, o un valor más extremo, bajo la hipótesis nula de que la contribución es igual a los diferentes grupos de semilla.

5.2.3.3. Estimaciones de parentesco

El coeficiente de parentesco (r) se calculó según Queller y Goodnight (1989) empleando el programa IDENTIX (Belkhir y col., 2002), que calcula los valores de r para cada par de individuos. El coeficiente de parentesco puede usarse para tratar de inferir la relación entre un par de individuos de una muestra a partir de las frecuencias alélicas.

Teóricamente, el valor del estimador r entre individuos que comparten ambos progenitores (hermanos completos) debe ser 0,5, mientras que entre medios hermanos, que únicamente comparten un 25% de su genoma, el coeficiente sería 0,25 y ≤ 0 entre individuos no relacionados (Queller y Goodnight, 1989).

5.2.3.4. Tamaño efectivo y tasa de endogamia

El tamaño efectivo (N_e) del lote de reproductores se estimó considerando tres supuestos:

- (a) que participasen todos los individuos reproductores utilizados, lo cual indicaría el nivel de endogamia mínimo que se generaría;
- (b) considerando únicamente los individuos que realmente dejan descendientes;
- (c) considerando la contribución diferencial de los individuos que intervienen.

En el caso de los supuestos (a) y (b) el tamaño efectivo se calculó según la ecuación de Falconer (1989):

$$N_e = \frac{4N_m N_h}{N_m + N_h}$$

Donde N_m y N_h son el número de machos y hembras, respectivamente.

Asumiendo el supuesto (c), el tamaño efectivo se calculó según Chevassus (1989):

$$N_e = \frac{4(N - 2)}{\left(M_h + \frac{V_h}{M_h}\right) + \left(M_m + \frac{V_m}{M_m}\right) - 2}$$

Donde N es el número de descendientes analizados, M_m y M_h son la media de descendientes por macho y hembra, y V_m y V_h son la varianza del número de

descendientes por macho y hembra, respectivamente. Las medias y las varianzas se calcularon con el paquete estadístico SPSS 15.0 (SPSS Inc).

Se estimó, también, el incremento de endogamia (ΔF) por generación según Falconer (1989):

$$\Delta F = \frac{1}{2Ne}$$

5.2.4. *Análisis de marcadores microsatélite: diversidad y diferenciación genética entre semilla, reproductores y población natural*

Con el objetivo de evaluar el impacto genético del proceso de obtención de semilla en criadero, se cuantificó la variabilidad genética existente, tanto en el lote de reproductores como en la semilla generada a partir de ellos, y se comparó con la del banco natural de Vilarrube, de donde procedieron los mismos.

El número de alelos (N_a), la heterocigosidad observada (H_o) y la heterocigosidad esperada (H_e) insesgada de Nei (Nei, 1978) se calcularon usando el programa Genetix v.4.03 (Belkhir y col., 2004). Los valores de riqueza alélica (R_s) por *locus* y por combinación *locus* – muestra se obtuvieron con el programa Fstat v.2.9.3.2 (Goudet, 2001). También se analizó la existencia de diferencias significativas entre los valores de heterocigosidad y riqueza alélica de las diferentes muestras mediante un test de Friedman utilizando el paquete estadístico SPSS 15.0 (SPSS Inc). En los casos en que el test de Friedman resultó significativo se realizó un análisis *post hoc* mediante el procedimiento de Wilcoxon-Nemenyi-McDonald-Thompson (Hollander y Wolfe, 1999) implementado en una función de R (Galili, 2010). Dos grupos se consideraron significativamente distintos cuando el valor absoluto de su diferencia de rangos fue igual o mayor que un valor r_α tabulado.

Se empleó el programa Genepop v.4.0. (Rousset, 2008) para realizar los test de bondad de ajuste al equilibrio HW y a las condiciones de equilibrio de ligamiento. La significación se determinó mediante un método de cadena de Markov utilizando 10 000 *dememorizations*, 5000 *batches* y 5000 iteraciones por *batch*. El sentido y la magnitud de las desviaciones del equilibrio HW se evaluaron mediante el coeficiente de endogamia (F_{is}) de Weir y Cockerham (1984) calculado con el programa Genetix v.4.03. Cuando se llevaron a cabo comparaciones múltiples, los valores de significación se ajustaron utilizando la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989).

La diferenciación genética global y entre pares de muestras se estimó mediante el índice de fijación (F_{st}) de Weir y Cockerham (1984) empleando el programa Genetix v.4.03. La significación de los valores F_{st} se determinó mediante un método no paramétrico basado en 10 000 permutaciones implementado en el mismo programa.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Rediseño y optimización de las PCRs multiplex

Con el objetivo de reducir el número de amplificaciones se decidió utilizar la *Multiplex 1* (Capítulo 2), ya que es la que incluye más *loci* (7), y optimizar el mayor número de *loci* posibles en una nueva PCR *multiplex* (*Multiplex 2'*). Esta *Multiplex 2'* incluyó a *loci* de las *Multiplex 2* y *3* desarrolladas en el Capítulo 2. Los *loci* Dtr273 y Dtr371 se descartaron debido al bajo número de alelos observados en la optimización de las PCRs *multiplex* (Tabla 2.5 – Capítulo 2) y el *locus* Dtr43 por las dificultades que presentó su análisis en el proceso de genotipado. De los cinco *loci* microsatélite restantes (Dtr47, Dtr90, Dtr108, Dtr117 y Dtr301) dos de ellos, Dtr47 y Dtr301, presentaban un número de alelos similar y los cebadores marcados con el mismo fluorocromo. Por ello, se decidió incluir el *locus* Dtr47 en la nueva PCR *multiplex* porque la determinación de sus alelos durante el genotipado fue sencilla. En la Tabla 5.2. se muestran las características de la *Multiplex 2'* una vez optimizada para una temperatura de hibridación de 60 °C.

Tabla 5.2. Características de la PCR *Multiplex 2'*

Locus	Fluorocromo	Concentración cebadores (µM)
Dtr47	VIC	0,20
Dtr90	PET	0,20
Dtr108	NED	0,10
Dtr117	FAM	0,20

5.3.2. Asignación de paternidad y contribución de los reproductores

La asignación de paternidad de los 699 individuos de semilla analizados se llevó a cabo utilizando 10 *loci* microsatélite. El programa MicroChecker sugirió la presencia de alelos nulos en seis de los 11 *loci* analizados en el lote de reproductores, aunque sólo en uno de ellos (Dtr126) a frecuencias superiores a 0,2. Teniendo en cuenta que la presencia de alelos nulos a frecuencias superiores a 0,2 puede dar lugar a una sobreestimación de las probabilidades de exclusión (Dakin y Avise, 2004), el *locus* Dtr126 fue excluido del análisis de paternidad.

La Tabla 5.3. muestra las características de los *loci* amplificados en el lote de reproductores. Los 10 *loci* microsatélite mostraron niveles de diversidad genética altos, con un número medio de alelos por *locus* de 12,100 y con valores medios de

heterocigosidad observada y esperada de 0,487 y 0,615, respectivamente. El valor global del contenido en información polimórfica también fue moderado (0,584).

Tabla 5.3. Características de los 10 microsatélites analizados en el lote de reproductores

<i>Locus</i>	<i>Na</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>PIC</i>	Exclusión 1	Exclusión 2
Dtr47	8	0,589	0,609	0,529	0,196	0,330
Dtr53	30	0,759	0,882	0,872	0,630	0,772
Dtr70	7	0,664	0,719	0,666	0,297	0,467
Dtr86	16	0,728	0,814	0,786	0,455	0,630
Dtr90	11	0,648	0,748	0,714	0,359	0,540
Dtr108	8	0,077	0,261	0,253	0,036	0,146
Dtr117	16	0,487	0,846	0,828	0,534	0,698
Dtr174	9	0,313	0,639	0,597	0,240	0,414
Dtr199	10	0,375	0,378	0,358	0,077	0,216
Dtr323	6	0,232	0,249	0,239	0,032	0,135
Global	12,100	0,487	0,615	0,584	0,978	0,999

Na: número de alelos; *Ho*: heterocigosidad observada; *He*: heterocigosidad esperada; *PIC*: contenido en información de polimorfismo y Probabilidad de Exclusión 1 y 2

Las probabilidades de exclusión por *locus* fueron medias, variando entre 0,032 y 0,630 cuando sólo se dispone del genotipo del descendiente (Exclusión 1), y entre 0,135 y 0,772 cuando se conoce también el genotipo de uno de los progenitores (Exclusión 2) (Tabla 5.3).

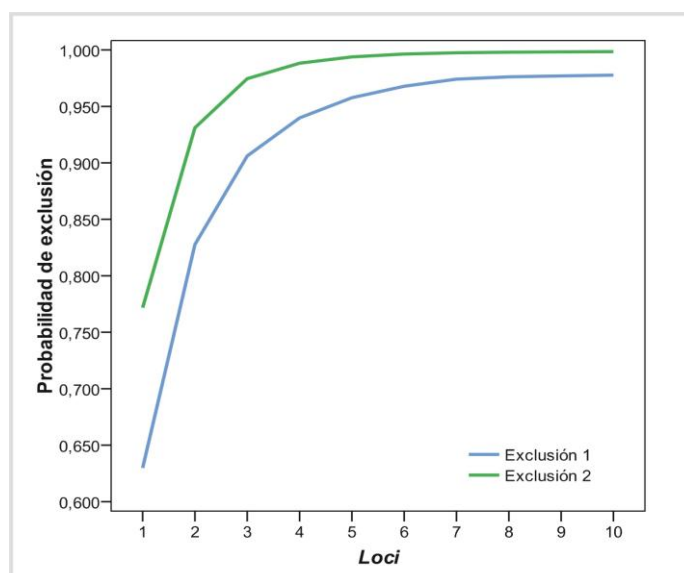


Figura 5.1. Probabilidad de exclusión tipo 1 y 2 cuando se combinaron de uno a diez *loci*. Los marcadores se añadieron en orden decreciente de valor *PIC*

El cálculo de la probabilidad de exclusión cuando se consideró simultáneamente distinto número de *loci* (de 1 a 10 y añadidos de más a menos informativo) mostró que con 5 o más *loci* se alcanzan valores superiores a 0,95 y 0,99 para la probabilidad de exclusión 1 y 2, respectivamente (Figura 5.1). Las probabilidades de exclusión combinadas de los 10 *loci* microsatélite empleados en el análisis fueron de 0,978 (Exclusión 1) y 0,999 (Exclusión 2).

En la simulación realizada previamente a la asignación real se obtuvo una tasa de asignación del 55% y 84% para un nivel de confianza estricto y relajado, respectivamente. Para llevar a cabo la asignación real se genotiparon un total de 1063 individuos, incluyendo 699 individuos de semilla, 170 hembras candidatas y 194 machos candidatos. Los individuos genotipados para menos de cinco *loci* microsatélite fueron excluidos del análisis (6 individuos de semilla y una madre candidata). En la asignación real los valores fueron inferiores a los obtenidos en la simulación previa, 33% y 76%. La asignación real en los grupos de semilla alcanzó los siguientes valores: 35% y 76% para el grupo de semilla T1; 27% y 79% para el grupo de semilla T2; 46% y 87% para el grupo de semilla T3; 21% y 61% para el grupo de semilla T4, según el nivel de confianza considerado, estricto y relajado, respectivamente.

Tabla 5.4. Participación de machos y hembras en la reproducción

	Nivel de confianza	N (%)	Md	Var	Rd
HEMBRAS (N = 170)	Relajado (80%)	78 (45,88%)	4,91	52,39	1 – 41
	Estricto (95%)	43 (25,29%)	5,14	39,36	1 - 29
MACHOS (N = 194)	Relajado (80%)	97 (50,00%)	3,08	23,84	1 – 35
	Estricto (95%)	57 (29,38%)	3,16	26,81	1 – 30
FAMILIAS (N* = 32980)	Relajado (80%)	417 (1,26%)	1,27	0,56	1 – 7
	Estricto (95%)	176 (0,53%)	1,32	0,52	1 – 5

N: número de madres, padres o familias; Md: número medio de descendientes; Var: varianza del número de descendientes; Rd: rango del número de descendientes. (*): familias potenciales

La Tabla 5.4 muestra el número y porcentaje de machos y hembras identificados como progenitores, así como el número medio de descendientes, el rango de descendientes y las familias detectadas, empleando niveles de confianza estricto y relajado. La proporción de sexos no mostró diferencias significativas al realizar un test binomial ni en el lote de reproductores (p -valor = 0,228) ni en los progenitores identificados bajo un nivel de confianza estricto (p -valor = 0,193) ni relajado (p -valor = 0,173). En el lote de reproductores utilizado, el porcentaje de machos y hembras que aportaron al menos un descendiente a la semilla analizada fue en torno a un 50% al considerar un nivel de confianza relajado, y alrededor de un 30% al considerar un nivel de confianza

estricto. La media y la varianza del número de hijos resultaron ligeramente superiores en las hembras, mientras que el rango del número de hijos fue similar en los dos sexos.

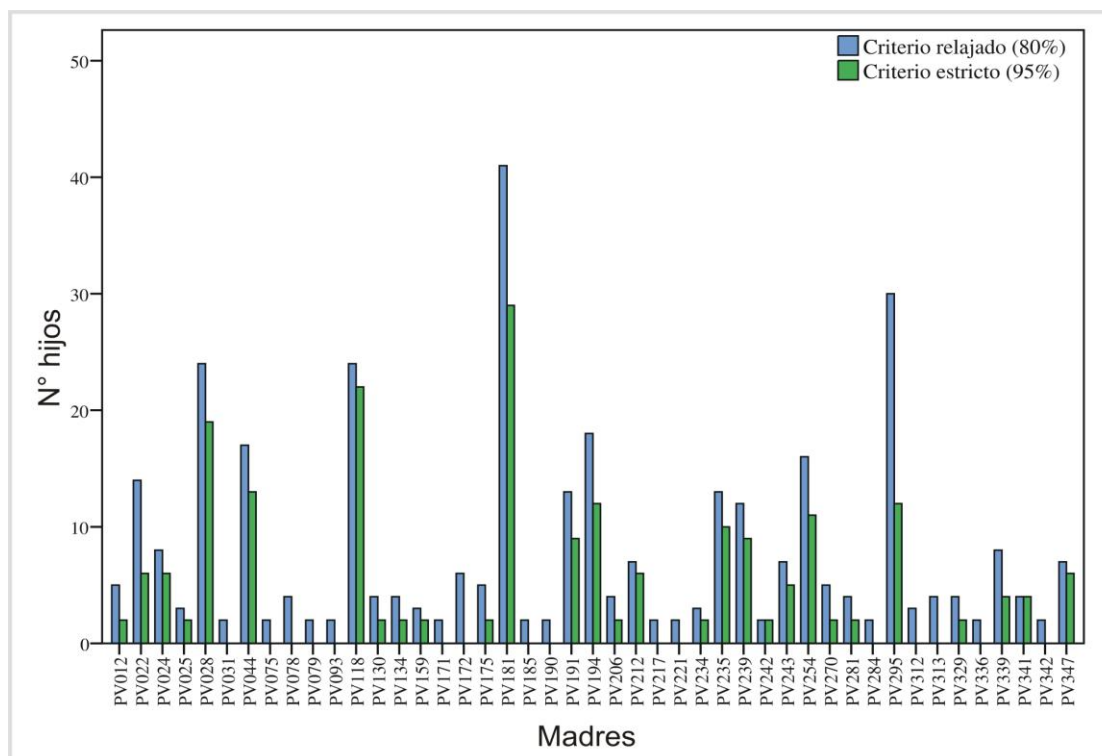


Figura 5.2. Contribución a la semilla de las madres con más de un descendiente

Las Figuras 5.2 y 5.3 representan la relación de madres y padres, respectivamente, que contribuyeron a la descendencia con dos o más descendientes. El porcentaje de madres que contribuyó a la descendencia con más de un hijo fue superior al 50%, tanto para un nivel de confianza relajado (57,69%) como estricto (67,44%). En el caso de los padres el porcentaje fue menor para ambos niveles de confianza (51,55% - nivel de confianza relajado; 45,61% - nivel de confianza estricto).

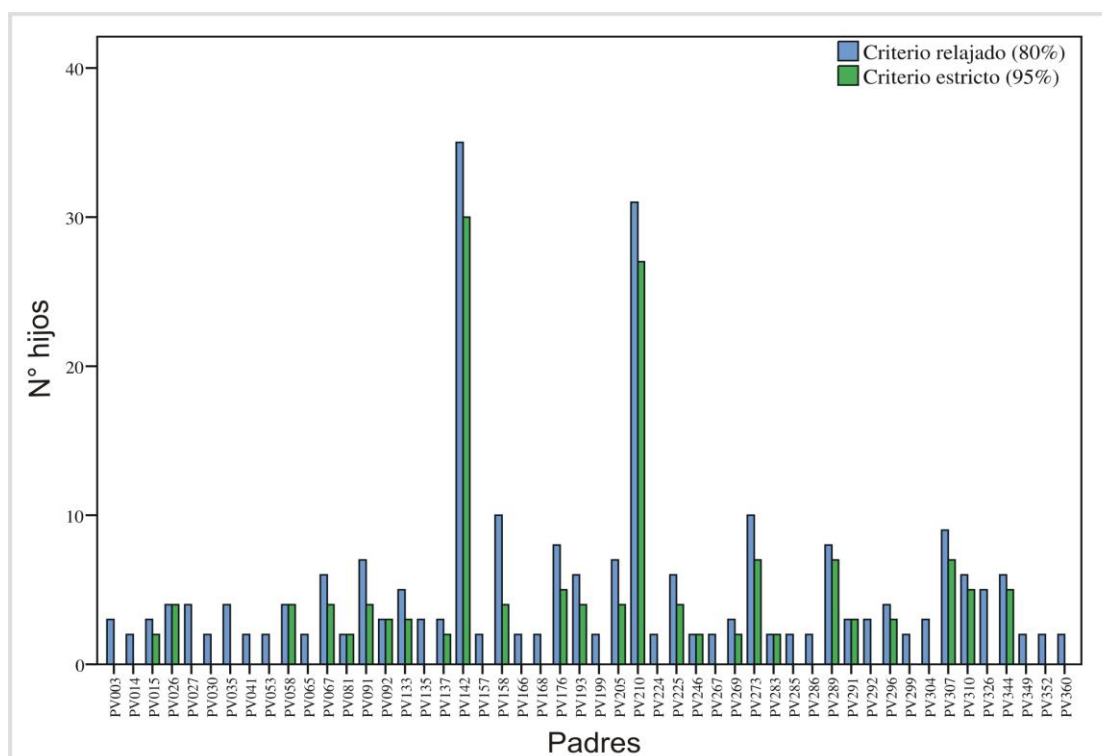


Figura 5.3. Contribución a la semilla de los padres con más de un descendiente

Con respecto a las familias, de las 32 980 posibles se detectaron únicamente 417 al considerar un nivel de confianza relajado y 176 con un nivel de confianza estricto (Tabla 5.4). La media, varianza y rango del número de hijos fue similar en los dos niveles de confianza. El porcentaje de parejas que contribuyeron a la descendencia con un único hijo fue elevado, alcanzado valores de 84,89% y 78,98% para niveles de confianza relajado y estricto, respectivamente. La Figura 5.4 muestra el número de parejas que contribuyeron con dos o más hijos a la descendencia. El porcentaje de familias que participaron en la descendencia con 2 y 3 hijos osciló entre un 6% y un 7% para un nivel de confianza relajado, y entre un 6% y un 13% para un nivel estricto. Respecto a las parejas que contribuyeron con más de tres hijos, el porcentaje fue inferior al 2% para ambos niveles de confianza, y sólo dos contribuyeron con 7 descendientes al considerar un nivel de confianza relajado.

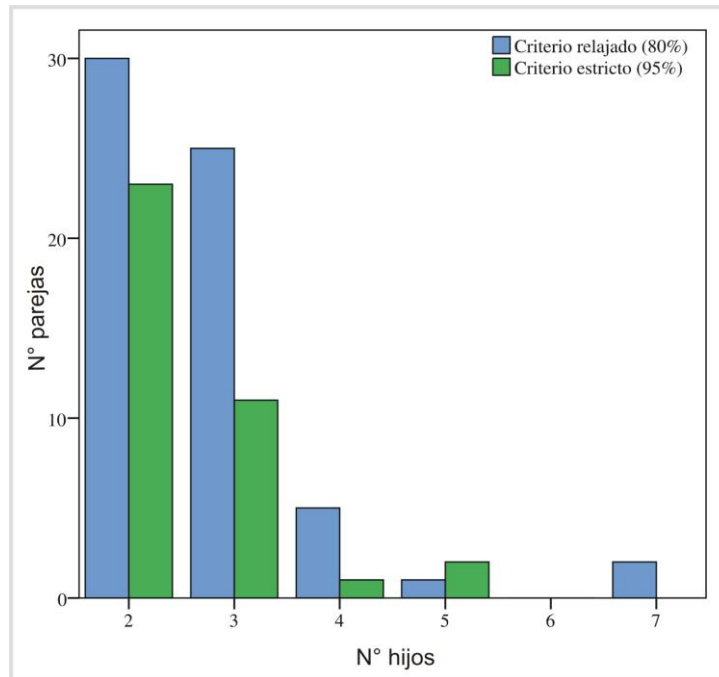


Figura 5.4. Contribución a la descendencia de las parejas con más de un hijo

Para evaluar la existencia de una contribución desigual de los progenitores, divididos por sexo, a la descendencia se realizó una prueba χ^2 , tanto para el total de la semilla como para cada grupo. En global, la contribución de machos y hembras fue significativamente distinta en los análisis realizados tanto para los progenitores identificados bajo un nivel de confianza relajado (Machos: $\chi^2 = 1004,879$, p -valor = 1×10^{-5} ; Hembras: $\chi^2 = 1144,742$, p -valor = 1×10^{-5}) como estricto (Machos: $\chi^2 = 498,629$, p -valor = 1×10^{-5} ; Hembras: $\chi^2 = 345,862$, p -valor = 1×10^{-5}). Al evaluar la contribución dentro de cada grupo de semilla, los machos mostraron contribución desigual significativa para ambos niveles de confianza en los grupos T1 (Criterio relajado: $\chi^2 = 461,152$, p -valor = 1×10^{-5} ; Criterio estricto: $\chi^2 = 237,725$, p -valor = 1×10^{-5}) y T3 (Criterio relajado: $\chi^2 = 104,931$, p -valor = 1×10^{-5} ; Criterio estricto: $\chi^2 = 55$, p -valor = $2,7 \times 10^{-4}$). En el caso de las hembras, éstas sólo mostraron diferencias significativas en el grupo de semilla T1 (Criterio relajado: $\chi^2 = 529,331$, p -valor = 1×10^{-5} ; Criterio estricto: $\chi^2 = 156,621$, p -valor = 1×10^{-5}).

Con el objetivo de conocer si los progenitores contribuyeron por igual a cada grupo de semilla se construyeron dos tablas de contingencia, una por sexo, incluyendo únicamente los progenitores que habían contribuido a la semilla con tres o más descendientes. Al testar la hipótesis de contribución igualitaria, ambos sexos mostraron diferencias significativas cuando los progenitores fueron identificados tanto bajo el criterio relajado (Machos: $\chi^2 = 1000,141$, p -valor = 1×10^{-5} ; Hembras: $\chi^2 =$

1141,800, p -valor = 1×10^{-5}) como bajo el estricto (Machos: $\chi^2 = 494,965$, p -valor = 1×10^{-5} ; Hembras: $\chi^2 = 344,124$, p -valor = 1×10^{-5}).

Mediante un método de remuestreo se identificaron los progenitores responsables de la contribución diferencial. Al realizar el análisis partiendo de los progenitores identificados bajo el criterio relajado se identificaron 9 machos responsables: un macho (PV253) que contribuyó significativamente más al grupo de semilla T2, tres machos (PV142, PV176 y PV311) que contribuyeron más al grupo de semilla T3 y cinco (PV003, PV041, PV176, PV273 y PV292) que lo hicieron más al grupo T4. Con respecto a las hembras, se identificó una (PV235) que contribuyó significativamente más al grupo T1, otra (PV281) que lo hizo para el grupo T2 y una última (PV342) que lo hizo para el grupo T4. Al llevar a cabo el análisis a partir de los progenitores identificados bajo el criterio estricto sólo se identificaron un macho (PV273) y una hembra (PV022) que contribuyeron significativamente más al grupo de semilla T4.

5.3.3. *Análisis de parentesco*

El valor medio del estimador del coeficiente de parentesco (r) para los reproductores fue próximo a 0, lo que sugiere que la mayoría de los individuos utilizados para producir semilla no están relacionados entre sí. Asimismo, este coeficiente se calculó para el total de la semilla y para cada uno de los grupos, y los valores medios obtenidos también fueron próximos a cero en todos los casos. Los valores obtenidos para las medias y medianas resultaron muy similares entre sí y se distribuyeron en torno a cero en todos los casos, situándose el tercer cuartil por debajo de 0,16 (Figura 4.5). Sin embargo, para las diferentes muestras existen comparaciones con valores en torno a 0,25 (medios hermanos), 0,5 (hermanos completos) e incluso valores superiores. En ciertos casos se obtuvieron valores próximos o iguales a 1, que corresponderían a hermanos gemelos o clones. Estos valores sugieren la existencia de individuos emparentados, tanto dentro del lote de reproductores como de la semilla obtenida. Además, destaca la presencia de un elevado número de comparaciones con valores inferiores a cero.

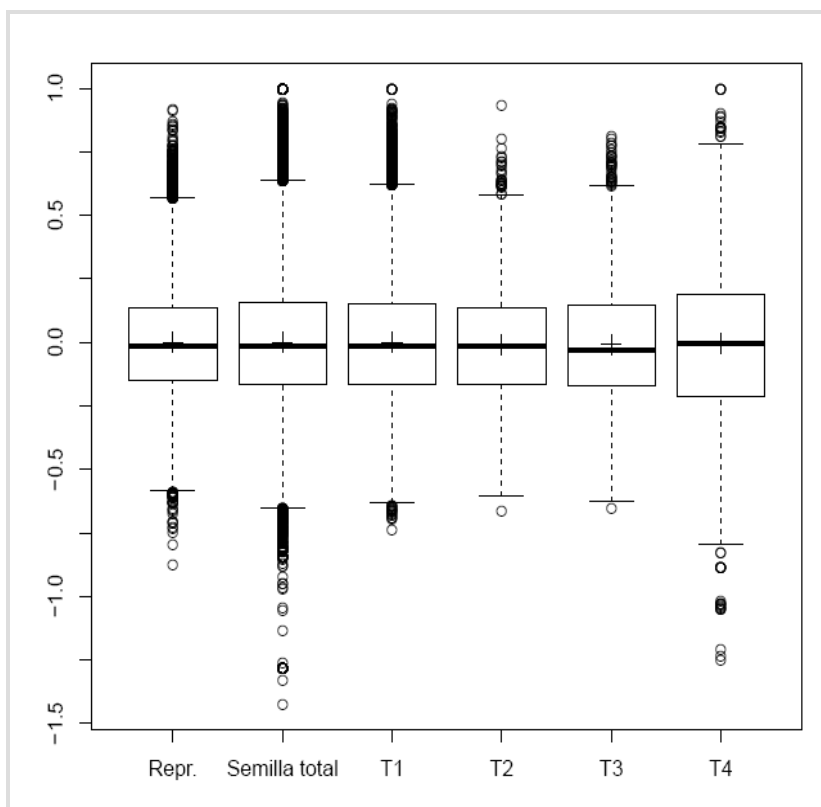


Figura 5.5. Valores de parentesco entre parejas de reproductores (Repr.), semilla total y grupos de semilla (T1, T2, T3 y T4), excluyendo a los individuos con menos de 6 *loci* genotipados y las comparaciones con valores inferiores a -2. Los extremos inferior y superior de las cajas representan el primer y el tercer cuartil, y la línea horizontal interna la mediana. Las cruces muestran la media. Las líneas verticales representan el intervalo entre el tercer y el primer cuartil y más menos 1,5 veces el rango intercuartílico, respectivamente. Los círculos indican los valores atípicos

5.3.4. Tamaño efectivo de reproductores y tasa de endogamia

La Tabla 5.5 recoge las estimas de N_e y ΔF en el lote de reproductores analizado asumiendo tres supuestos. (a) Considerando que todos los individuos del lote de reproductores ($N=364$) hubieran contribuido por igual a la descendencia, el tamaño efectivo sería de 362,42, lo que supondría un incremento de endogamia del 0,14%. (b) Al considerar únicamente los individuos que participaron en la reproducción (progenitores) identificados bajo un nivel de confianza del 80%, el tamaño efectivo fue 172,94 y el incremento de endogamia 0,29%, mientras que, considerando únicamente los progenitores identificados con un nivel de confianza del 95% el tamaño efectivo fue 98,04 y el incremento de endogamia 0,51%. (c) Teniendo en cuenta la contribución diferencial de padres y madres, el tamaño efectivo fue 86,23 y el incremento de endogamia 0,58% al considerar los progenitores identificados bajo un criterio relajado,

y 40,99 y 1,22%, respectivamente, bajo un criterio estricto. Los valores de tamaño efectivo obtenidos asumiendo el último supuesto, suponen, en ambos casos, más de un 75% de reducción respecto al número de individuos del lote de reproductores.

Tabla 5.5. Estimaciones de N_e y ΔF asumiendo tres supuestos.

		N_e	$\Delta F(\%)$
(a) Todos los reproductores		362,42	0,14
(b) Reproductores con descendencia	Criterio relajado (80%)	172,94	0,29
	Criterio estricto (95%)	98,04	0,51
(c) Contribución diferencial reproductores	Criterio relajado (80%)	86,23	0,58
	Criterio estricto (95%)	40,99	1,22

5.3.5. Análisis de marcadores microsatélite

5.3.5.1. Diversidad genética en población natural, reproductores y semilla

Con el objetivo de evaluar la diversidad genética en los reproductores y la semilla obtenida en criadero se genotiparon un total de 11 *loci* microsatélite (*Multiplex 1* y *Multiplex 2'*) en los 364 reproductores y en 699 individuos de semilla. Los valores de diversidad obtenidos (ANEXO G) se compararon con los estimados para la muestra de la misma localidad que los reproductores (Vilarrube), analizada en el Capítulo 3 y referida de en adelante como población natural. La Tabla 5.6 recoge los valores globales de los índices de diversidad estimados. Todas las muestras excepto el grupo de semilla T4 mostraron un número medio de alelos por *locus* superior al de la población natural (8,091) debido, probablemente, al menor tamaño de esta última. Cuatro alelos observados en la semilla no se encontraron en los reproductores y, por otro lado, veinticuatro alelos observados en los reproductores no se encontraron en la semilla. La riqueza alélica media de las tres muestras fue similar, encontrándose el valor más elevado en el lote de reproductores (8,414) y el más bajo en la semilla (7,323). Al analizar la riqueza alélica media considerando los diferentes grupos de semilla, los valores oscilaron entre 6,487 (semilla grupo T4) y 8,182 (reproductores). Todos los grupos de semilla mostraron valores de riqueza alélica media inferiores a los observados en los reproductores y en la población natural. Todas las muestras exhibieron valores medios de heterocigosidad esperada y observada muy similares (0,602 – 0,628 y 0,466 – 0,501, respectivamente).

Tabla 5.6. Diversidad genética de la población natural, los reproductores y la semilla.

	Población natural	Reproductores	Semilla				Total
			T1	T2	T3	T4	
<i>N</i>	50	364	400	100	100	99	699
<i>Na</i>	8,091	12,636	10,273	8,727	8,364	7,273	10,727
<i>Rs</i> ₁	7,470	8,182	7,172	6,946	7,112	6,487	-
<i>Rs</i> ₂	7,664	8,414	-	-	-	-	7,323
<i>He</i>	0,619	0,628	0,617	0,602	0,642	0,602	0,619
<i>Ho</i>	0,474	0,469	0,484	0,466	0,490	0,501	0,484

N: número de individuos; *Na*: número medio de alelos; *Rs*: riqueza alélica calculada en base a 31, *Rs*₁, o 34 individuos, *Rs*₂; *He*: heterocigosidad esperada media y *Ho*: heterocigosidad observada media

Al aplicar el test de Friedman a los valores de riqueza alélica y heterocigosidad observada y esperada de las diferentes muestras, no se observaron diferencias significativas en la comparación población natural-reproductores-semilla total. Sin embargo, al aplicar el test para la comparación población natural-reproductores-grupos de semilla se observaron diferencias significativas en la riqueza alélica. Con el test *post hoc* realizado se detectaron diferencias significativas en dos grupos de semilla (T2 y T4) frente a los reproductores.

Los análisis de desequilibrio de ligamiento mostraron resultados significativos en el caso de la semilla. Al contrario que reproductores y población natural, se encontraron 41 combinaciones de *loci* en la semilla que mostraron desequilibrio de ligamiento tras la corrección secuencial de Bonferroni. En el análisis por grupos de semilla, el desequilibrio de ligamiento se detectó en 14 combinaciones de *loci* del grupo de semilla T1, una combinación en el grupo T2 y otra en el T4, tras la corrección secuencial de Bonferroni.

5.3.5.2. Diferenciación genética en población natural, reproductores y semilla

La diferenciación genética de los reproductores y de los diferentes grupos de semilla respecto a la población natural se evaluó empleando 10 *loci* microsatélite. El *loci* Dtr126 se excluyó del análisis por detectarse alelos nulos en frecuencias iguales o superiores a 0,2 en la mayoría de las muestras analizadas.

Los valores *Fst* por pares de muestras se presentan en la Tabla 5.7. El lote de reproductores no mostró diferencias significativas con la población natural, por lo que puede considerarse que los individuos utilizados como reproductores en el criadero constituyen una muestra representativa de los individuos del banco natural del que

proceden. Sin embargo, sí existen diferencias significativas al comparar los diferentes grupos de semilla con la población natural y con los reproductores. Los cuatro grupos de semilla mostraron diferencias significativas, tras la corrección secuencial de Bonferroni, respecto a los reproductores de los que proceden, mientras que únicamente dos (Semilla T2 y Semilla T4) mostraron diferencias significativas respecto a la población natural tras Bonferroni. Asimismo, los grupos de semilla T1, T2 y T3 mostraron diferenciación genética significativa respecto al grupo T4, con valores F_{st} superiores al doble de los observados entre ellos. Además, los grupos T1 y T3 mostraron diferenciación significativa entre sí pero con un valor F_{st} inferior.

Tabla 5.7. Valores F_{st} por pares de muestras.

	Reproductores	Semilla T1	Semilla T2	Semilla T3	Semilla T4
Población natural	<0,001	0,005*	0,009**	0,006*	0,014**
Reproductores		0,005**	0,007**	0,006**	0,013**
Semilla T1			<0,001	0,004**	0,013**
Semilla T2				0,005*	0,012**
Semilla T3					0,015**

(*): significativo para un $\alpha = 0,05$; (**): significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni

5.4. DISCUSIÓN

La producción de semilla de bivalvos en criadero puede contribuir a la recuperación de bancos naturales sobreexplotados, ya que proporciona individuos para llevar a cabo la repoblación de los mismos. En este contexto, es fundamental el empleo en criadero de reproductores genéticamente representativos de la población natural para minimizar los cambios en el acervo génico (Frankham y col., 2002; Allendorf y col., 2013). El principal objetivo de la gestión genética del cultivo en cautividad es evitar la pérdida de diversidad genética y el consiguiente incremento de endogamia (Frankham y col., 2002). Con ello se pretende asegurar el potencial adaptativo a largo plazo de las especies.

Los marcadores microsatélite constituyen una poderosa herramienta para la asignación de paternidad así como para la evaluación de la diversidad genética y el coeficiente de endogamia, parámetros relevantes en el cultivo en criadero. Así, se han empleado con este fin en diferentes especies de organismos marinos empleados en criadero, como bivalvos (Boudry y col., 2002; Lallias y col., 2010a, b; Borrell y col., 2014; Dai y col., 2014), gasterópodos (Lemay y Boulding, 2009; Lafarga-de la Cruz y col., 2015), crustáceos (Xu y col., 2001; Jerry y col., 2004; Dong y col., 2006) o peces (Sekino y col., 2003b; Castro y col., 2004; Borrell y col., 2011; Lončar y col., 2014). Sin embargo, el empleo de marcadores microsatélite en los análisis de paternidad en acuicultura está restringido, habitualmente, por consideraciones económicas. Por este motivo, el establecimiento del menor número posible de *loci* microsatélite para los análisis de pedigrí es un punto importante para la aplicación de esta metodología de forma rutinaria en los programas de repoblación. En el proceso de rediseño de las PCRs *multiplex*, previo al análisis de paternidades realizado en este trabajo, se consideraron tanto el nivel de polimorfismo como las dificultades en el proceso de genotipado para descartar algunos *loci* (Dtr43, Dtr273, Dtr301 y Dtr371) y reducir el número de amplificaciones. Al inicio de este trabajo se amplificaron un total de 11 *loci* microsatélite distribuidos en dos PCRs *multiplex*. Sin embargo, el *locus* Dtr126 fue eliminado del estudio posteriormente por estimarse alelos nulos en frecuencias superiores a 0,2. Dakin y Avise (2004) sugieren descartar para los análisis de paternidad los *loci* con esas frecuencias de alelos nulos porque sobreestiman las probabilidades de exclusión. Además, la presencia de alelos nulos constituye una fuente de incompatibilidades en la asignación de paternidades (Marshall y col., 1998). Por ello, finalmente, se emplearon 10 marcadores microsatélite, un número similar al

empleado en otros estudios de paternidades en organismos marinos (Li y col., 2010; Borrell y col., 2011; Morvezen y col., 2013).

El nivel de variación genética existente influye de forma determinante en la correcta asignación de los individuos de semilla a sus progenitores, ya que esta diversidad es la que determina el potencial de exclusión, es decir, la probabilidad de excluir a un individuo cualquiera como padre o madre de un descendiente dado. La probabilidad de exclusión depende del número de *loci* analizados, el número de alelos por *locus* y las frecuencias alélicas en los mismos (Chakraborty y col., 1988). En este estudio se emplearon 10 *loci* microsatélite con un nivel de variabilidad genética medio (He media=0,615) y un número de alelos moderado (Na medio=12,100). Sin embargo, a pesar de que los niveles de diversidad por *loci* fueron moderados y los potenciales de exclusión relativamente bajos, los valores globales fueron elevados, tanto cuando no se conocía ninguno de los parentales (Exclusión 1) como en caso de conocer uno de ellos (Exclusión 2), alcanzando valores de 0,978 y 0,999, respectivamente. Estos potenciales de exclusión son ligeramente superiores a los observados en la almeja babosa *Venerupis pullastra* (Exclusión 1=0,954 y Exclusión 2=0,997) en un estudio realizado empleando 13 marcadores microsatélite con un número medio de alelos menor (Na =8,460) y con un menor nivel de diversidad (He =0,535) (Pereira, 2013). Sin embargo, son ligeramente inferiores a los observados en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* (Exclusión 1=0,9904 y Exclusión 2=0,9996) en un estudio realizado con 11 *loci* que presentaban mayor variabilidad (He =0,724) (Pino-Querido y col., 2014).

En este trabajo se llevó a cabo la asignación de paternidades de 699 individuos de semilla obtenidos en criadero por desove masivo de un total de 364 progenitores. En la simulación realizada se obtuvieron porcentajes de asignación del 55% y 84%, y en la asignación real del 33% y 76% para niveles de confianza del 95% y 80%, respectivamente. Este descenso en la asignación real está relacionado con diferentes factores que afectan al poder de las técnicas de asignación, y entre ellos se incluyen la variación de los marcadores, la presencia de alelos nulos, la segregación dependiente de los *loci*, eventos de mutación y errores de genotipado (Castro y col., 2004; Dakin y Avise, 2004; Vandeputte y col., 2011; Karaket y Poompuang, 2012). De ellos, los alelos nulos son uno de los factores más problemáticos en la asignación de paternidades. Sin embargo, en este trabajo sólo se observaron frecuencias elevadas en uno de los *loci* (Dtr126) y éste fue excluido del análisis, por lo que es poco probable que este tipo de alelos tuviese un efecto significativo. La segregación dependiente de

los *loci* también puede descartarse ya que tanto en los reproductores como en las poblaciones naturales estudiadas previamente (Capítulo 3) no se detectaron evidencias de desequilibrio de ligamiento entre los *loci* analizados. En el caso de la semilla, la observación de combinaciones de *loci* con segregación dependiente podría ser consecuencia de un número limitado de reproductores. En poblaciones finitas, la deriva genética altera las frecuencias alélicas de generación en generación. Estas fluctuaciones estocásticas, en poblaciones pequeñas, pueden resultar en asociaciones no aleatorias de alelos entre diferentes *loci* (Hedrick, 2000). Dada la existencia de alelos nuevos en individuos de semilla no se puede excluir el efecto de la mutación, pero dadas las tasas de mutación usualmente observadas para microsatélites en otros grupos taxonómicos ($10^{-3} - 10^{-6}$; Lai y Sun, 2003), es probable que mayormente se deban a errores de genotipado. Los fallos de genotipado pueden haber tenido un efecto en la asignación de paternidades. La calidad y cantidad de ADN, así como, las condiciones de amplificación son algunas de las causas que pueden conducir a los fallos de genotipado y, por tanto, a la falsa exclusión del verdadero progenitor (Wang, 2010a). En este trabajo el protocolo empleado para la extracción de ADN está basado en la resina Chelex y, aunque es un método rápido, sencillo y de bajo coste, no proporciona un ADN tan íntegro y puro como el obtenido con otros protocolos clásicos, como los basados en la extracción con solventes orgánicos. La menor pureza del ADN puede provocar la existencia de problemas de amplificación y genotipado de los marcadores microsatélite. Además, se espera que los problemas de amplificación sean más notables a medida que incrementa el número de marcadores (Vandeputte y col., 2011). En este caso se han utilizado 10 *loci*, aunque no ha sido posible el genotipado de todos ellos en el total de individuos analizados. De hecho, en el lote de reproductores se han genotipado para todos los *loci* el 49% de los individuos, mientras que en el caso de la semilla este porcentaje descendió hasta un 39%. Por tanto, es probable que los errores de genotipado sean uno de los factores involucrados en la baja asignación de paternidades.

Conocer el nivel de parentesco entre los individuos utilizados como reproductores en el criadero resulta fundamental para mantener un elevado nivel de variabilidad genética, así como para evitar la aparición de endogamia en futuras generaciones (Ortega-Villaizán Romo y col., 2006). Si los fundadores de una población en criadero están genéticamente relacionados, es probable que se produzca el apareamiento entre individuos relacionados, generándose un incremento en el nivel de endogamia, lo cual conllevaría una pérdida de heterocigosidad y una posible reducción de la eficacia biológica (Allendorf y col., 2013). Además, en el contexto de la acuicultura

resulta importante analizar el nivel de parentesco entre los individuos de semilla obtenidos, ya que la elevada fecundidad que presentan muchas especies de organismos marinos puede dar lugar a que muy pocos progenitores produzcan grandes cohortes, lo cual resultaría en poblaciones con grandes proporciones de individuos íntimamente relacionados (Lind y col., 2009; Hedgecock y Pudovkin, 2011). En este trabajo los valores medios del coeficiente de parentesco se situaron próximos a cero tanto en el caso de los reproductores como en la semilla total y en los diferentes grupos. Sin embargo, la estimación de parentesco entre algunos individuos mostró valores del orden de 0,25 (medios hermanos), 0,5 (hermanos completos) o mayores, sugiriendo la existencia de parentesco entre ellos. El parentesco existente entre los individuos incluidos en el análisis de paternidad es una de las posibles causas de las diferencias observadas entre los porcentajes de asignación real y de la simulación (Borrell, 2002). En el análisis de paternidad realizado para *D. trunculus* en este trabajo se han observado diferencias considerables entre estos porcentajes. La existencia de individuos emparentados en estos análisis podría dar lugar a que un individuo no progenitor posea una combinación de alelos compatible con la de algún descendiente. Además, debe considerarse el nivel de polimorfismo de los *loci* empleados en el análisis, ya que, si los marcadores no son lo suficientemente polimórficos resultará complicado resolver las relaciones de paternidad. Asimismo, debe tenerse en cuenta que la determinación de las relaciones de parentesco puede resultar poco fiable cuando se emplea un número limitado de marcadores (Kalinowski y col., 2006). En el caso de *D. trunculus*, las probabilidades de exclusión globales fueron elevadas (superiores a 0,97) aunque el valor PIC del conjunto de *loci* empleado en el análisis fue medio (0,584). El incremento en el número de *loci*, así como, la selección de los que poseen un mayor grado de polimorfismo podrían ayudar a mejorar los resultados de los análisis de paternidad.

Además, en las comparaciones de parentesco entre individuos se observó un elevado número de valores inesperados, tanto negativos como positivos. La existencia de comparaciones con valores negativos implica que el parentesco entre ese par de individuos es inferior al esperado entre dos individuos tomados al azar (Queller y Goodnight, 1989). Esta situación ocurre cuando las frecuencias génicas de los dos individuos comparados se desvían de la media poblacional en direcciones opuestas (Queller y Goodnight, 1989). Además de estos valores atípicos, tanto en reproductores como en semilla se observó la presencia de numerosas comparaciones con valores de parentesco superior a 0,5. En ocasiones, estos valores fueron próximos a uno, el valor esperado entre gemelos o clones. Al analizar los individuos con mayor número de

comparaciones con valores de parentesco elevados ($r > 0,5$) se observó la existencia de un alto porcentaje de *loci* en homocigosis respecto al total de *loci* genotipados para ese individuo concreto, alcanzando en ocasiones porcentajes superiores al 80%. Los alelos en homocigosis correspondieron en general a los alelos más frecuentes para cada *loci*, lo que haría más probable que dos individuos compartieran genotipo. El uso de *loci* un mayor grado de polimorfismo o el incremento en el número de marcadores permitiría dilucidar con mayor precisión las relaciones de parentesco y mejorar los análisis de paternidad.

Los programas de mejora de las poblaciones naturales mediante la repoblación con individuos obtenidos en criadero deben prestar especial atención al tamaño efectivo de los progenitores empleados, ya que un tamaño efectivo reducido puede conducir a una reducción severa del tamaño efectivo de la población natural (Ryman y Laikre, 1991). El tamaño efectivo está inversamente relacionado con la endogamia y la deriva genética, por lo que los programas de reproducción en criadero deben intentar maximizar la proporción entre el tamaño efectivo de los progenitores y el número real de los mismos (N_e/M) para evitar, en la medida de lo posible, la pérdida de variabilidad genética. El análisis de paternidad realizado en este trabajo ha permitido estimar el número real de padres y madres que han contribuido a la semilla producida en criadero y, por tanto, evaluar el tamaño efectivo del lote de reproductores. El tamaño efectivo estimado en este estudio resultó considerablemente menor que el número de individuos del lote de reproductores, observándose una reducción superior al 75% en ambos niveles de confianza. Las reducciones en el tamaño efectivo han sido detectadas en otras especies de moluscos bivalvos (Boudry y col., 2002; Hedgecock y col., 2007; Lallias y col., 2010b; Li y col., 2009; Lind y col., 2009; Borrell y col., 2014) y están causadas por diferentes factores, entre los que destacan un ratio de sexos desigual, una elevada varianza del tamaño familiar y una contribución desigual de los progenitores (Frankham, 1995; Boudry y col., 2002; Li y col., 2009). En este trabajo la proporción de sexos se mantuvo equilibrada, por lo que la reducción observada no puede atribuirse a este factor. Además, en general, una proporción de sexos sesgada no produce un gran efecto en el tamaño efectivo a no ser que exista un exceso considerable de uno de los sexos frente al otro (Allendorf y col., 2013). Por tanto, la reducción observada puede atribuirse principalmente a la contribución desigual de los progenitores y a la varianza del tamaño familiar, lo que podría conducir a que algunos individuos adultos no contribuyeran o lo hicieran de forma mínima al patrimonio génico de la siguiente generación (Frankham y col., 2002). En organismos marinos que presentan elevadas tasas de fecundidad y mortalidad temprana es habitual que exista

una variación substancial en el éxito reproductivo (Hedgewood, 1994). Esta variación se ha detectado en varias especies de moluscos, tanto en condiciones naturales (Li y Hedgewood, 1998; Hedgewood y col., 2007) como experimentales (Boudry y col., 2002; Petersen y col., 2008; Lemay y Boulding, 2009; Li y col., 2009; Lallias y col., 2010b). En este trabajo se ha detectado una contribución diferencial significativa en ambos sexos, 9 machos y 3 hembras bajo un nivel de confianza relajado, y un macho y una hembra bajo un nivel de confianza estricto. Esta contribución diferencial puede estar relacionada con diferentes factores, entre los que destacan la calidad y cantidad de gametos, la interacción entre el huevo y el espermatozoide, la competición cigótica y la diferente viabilidad entre las familias (Boudry y col., 2002; Lallias y col., 2010b; Dai y col., 2014).

Con el objetivo de llevar a cabo estrategias eficaces de cultivo en criadero y repoblación de los bancos naturales con la semilla obtenida, debe mantenerse bajo control el incremento de endogamia por generación. Este coeficiente se puede obtener a partir de la estima de tamaño efectivo de los reproductores y resulta equivalente a la pérdida de heterocigosidad (Frankham y col., 2002). La endogamia puede afectar negativamente a diferentes aspectos reproductivos, como son el número de descendientes, la supervivencia de los juveniles, la longevidad, la cantidad y calidad del espermatozoide o la habilidad competitiva, entre otros (Frankham y col., 2002). Esto conlleva a una reducción de la eficacia biológica, un fenómeno conocido como depresión endogámica. Esta depresión puede ser el resultado de un incremento de la homocigosidad de alelos deletéreos recesivos que estaban en heterocigosis, o bien, de un descenso de la heterocigosidad en *loci* con ventaja del heterocigoto (sobredominancia) (Charlesworth y Charlesworth, 1999; Tave, 1999). La depresión endogámica resultará de mayor o menor severidad en función del nivel de endogamia, del fenotipo en cuestión y de la población (Tave, 1999). En el caso de las poblaciones de criadero, se desconoce el nivel de endogamia que genera problemas, pero si las poblaciones son cultivadas para programas de repoblación se ha sugerido que el nivel de endogamia debe ser inferior al 5% (Tave, 1999). En este trabajo las estimas de incremento de endogamia obtenidas son inferiores a este valor, lo cual minimizaría los efectos negativos.

Al igual que la endogamia, la deriva genética está inversamente relacionada con el tamaño efectivo de los progenitores y constituye una de las principales fuentes de cambios genéticos en el criadero, ya que se relaciona con una pérdida de heterocigosidad y diversidad alélica, lo cual puede tener consecuencias severas en la

descendencia obtenida (Allendorf y col., 2013). Cuando las poblaciones se reproducen la siguiente generación deriva de la muestra de los gametos de los progenitores y, por azar, algunos alelos, especialmente los raros, pueden no pasar a los descendientes y perderse (Frankham y col., 2002). En las poblaciones pequeñas se espera que la deriva genética actúe con mayor intensidad, provocando la pérdida de variabilidad genética, lo cual reduce el potencial para adaptarse a condiciones ambientales cambiantes y por tanto, las hace más vulnerables a la extinción (Frankham y col., 2002; Leberg y Firmin, 2008). Esta pérdida de alelos tiene dos consecuencias principales: un incremento de la homocigosidad y una reducción en la varianza genética (Tave, 1999). El incremento en la homocigosidad tiene un efecto similar al analizado previamente para el caso de la endogamia. En el caso de la varianza genética, esta constituye el material sobre el que actúa la selección, de forma que, si no existe varianza genética, no habrá diferencias heredables, lo cual significa que la selección no va a mejorar un fenotipo dado (Tave, 1999). En los casos en que los individuos son cultivados para llevar a cabo proyectos de repoblación, la pérdida de varianza genética puede suponer el fracaso del proyecto, por lo que debe conservarse la mayor parte de la variación genética posible, evitando la pérdida de alelos con frecuencias de 0,01 – 0,001 (Tave, 1999). Considerando el tamaño efectivo de los reproductores, las tablas elaboradas por Tave (1999) permiten estimar la probabilidad de perder alelos a frecuencias de 0,01 y 0,001. En este trabajo, se calcularon los tamaños efectivos bajo ambos niveles de confianza. Al considerar el valor obtenido bajo el nivel de confianza relajado ($N_e=86,23$), la probabilidad de perder alelos a frecuencias de 0,01 y 0,001 sería de 0,181 y 0,844, respectivamente. Mientras que bajo el criterio estricto ($N_e=40,99$) estas probabilidades aumentarían a 0,448 y 0,923, respectivamente. Estos datos indican la existencia de un riesgo elevado de perder los alelos de menor frecuencia y, considerando el tamaño efectivo estimado bajo el nivel de confianza estricto, también lo habría de perder los alelos a frecuencias de 0,01. A pesar de ello, debe considerarse que la pérdida de alelos supone un gran problema cuando la semilla obtenida se emplea para fundar una población, pero este efecto resulta secundario cuando ésta se utiliza para repoblación de un banco natural con un tamaño efectivo alto (Gaffney, 2006).

La conservación de la diversidad genética en las poblaciones es uno de los objetivos más importantes en los programas de mejora en acuicultura. Frankham y col. (2002) sugieren que los programas de cultivo en criadero deberían de preservar el 90% de la diversidad genética original durante unos 100 años. Sin embargo, en muchas poblaciones este objetivo debe ser relajado, ya que resulta inalcanzable debido a la

existencia de pocos progenitores y/o limitaciones de espacio. Generalmente, el cultivo en criadero de organismos marinos con elevadas tasas de fecundidad resulta en una reducción de la variabilidad genética debido a que un pequeño número de progenitores puede producir un elevado número de descendientes (Hedgecock y col., 1994). La existencia de una diversidad genética reducida en los stocks producidos en criadero con respecto a las poblaciones progenitoras del medio natural se ha observado en diferentes especies de acuicultura, tanto moluscos (Evans y col., 2004; Taris y col., 2006; Lemay y Boulding, 2009; Lind y col., 2009; Lallias y col., 2010a; Borrell y col., 2014) como peces (Liu y col., 2005; Porta y col., 2006a; Machado-Schiaffino y col., 2007; Wachirachaikarn y col., 2011) o crustáceos (Xu y col., 2001). En este estudio no se detectaron diferencias significativas en los valores de riqueza alélica ni en los de heterocigosidad observada y esperada entre la semilla total producida y los reproductores recogidos en el medio natural. Además, los valores de heterocigosidad observada y esperada muestran que la variabilidad presente en los diferentes grupos de semilla es comparable a la detectada en la población natural. Sin embargo, al comparar la riqueza alélica en los diferentes grupos de semilla se detectaron diferencias significativas en los grupos de semilla T2 y T4 respecto a sus progenitores, con reducciones de un 15% y un 21% respectivamente. Este descenso en la riqueza alélica de la semilla respecto a sus reproductores es del orden de la observada en la almeja fina *Ruditapes decussatus*, en la cual este descenso oscila entre un 9 y un 19% en diferentes lotes de reproductores y semilla (Borrell y col., 2014). En términos de heterocigosidad esperada, las reducciones observadas en los grupos de semilla T2 y T4 han sido muy inferiores a las obtenidas en la riqueza alélica, alcanzando en ambos casos valores de un 4%. Este resultado es esperable dado que la heterocigosidad disminuye más lentamente con el tiempo y puede no ser lo suficientemente sensible para detectar un cuello de botella reciente (Nei y col., 1975; Amos y Balmford, 2001). En diferentes estudios se ha observado que una reducción considerable en el número de alelos por *locus* supone ligeros cambios en las medidas de heterocigosidad (English y col., 2000; Evans y col., 2004; Yu y Chu, 2006; Lemay y Boulding, 2009; Borrell y col., 2014). Por ello, es esencial emplear diferentes índices de diversidad genética y comparar los valores obtenidos en la descendencia con los calculados para progenitores y población natural. No obstante, es importante destacar que la pérdida de alelos constituye un descenso en la variación genética disponible para futuras generaciones, por lo que esta reducción podría suponer un problema para el cultivo en criadero de sucesivas generaciones. Sin embargo, en los casos en los que la semilla obtenida se emplea para repoblación y no como futuros reproductores se espera que el impacto ocasionado sea menor, aunque esto estará condicionado por

la proporción de semilla empleada respecto al tamaño poblacional del banco natural. En este trabajo la riqueza alélica media del conjunto de semilla es similar a la existente en el banco natural, con un descenso inferior al 5%, por lo que se esperaría un mínimo impacto.

Los análisis realizados demuestran que el lote de individuos utilizado como progenitores en el criadero constituye una muestra genéticamente representativa del banco natural del que proceden. Sin embargo, la semilla producida difiere significativamente de sus progenitores y dos grupos de semilla (T2 y T4) también lo hacen, tras la corrección secuencial de Bonferroni, respecto a la población natural. La existencia de diferenciación genética entre la descendencia obtenida en el criadero y los progenitores y/o la población natural también se ha documentado en otros organismos marinos sometidos al cultivo en criadero (Liu y col., 2005; Lallias y col., 2010a; Wachirachaikarn y col., 2011; Borrell y col., 2014). La diferenciación genética detectada en este trabajo puede ser atribuida a la deriva genética pero también a la selección natural existente en el proceso de cultivo en criadero (Pampoulie y col., 2006; Camara y Vadopalas, 2009). Las poblaciones naturales que crecen en criadero están, de forma inadvertida, seleccionadas por su habilidad para reproducirse en un ambiente de cautividad. Dado que en este caso tanto la presencia de depredadores como de enfermedades está controlada, la selección natural para estos caracteres está más relajada (Frankham y col., 2002). La selección que se produce en el criadero promueve la adaptación de los individuos a las condiciones de cautividad y cada uno de estos cambios disminuirá la adaptación de estos individuos a las condiciones naturales (Allendorf y col., 2013). En el caso de sembrarse en el medio natural semilla genéticamente diferente de la población natural, uno de los principales peligros genéticos es la depresión exogámica, que consiste en una reducción de la eficacia biológica como resultado de la hibridación entre stocks genéticamente diferentes (Ward, 2006). La depresión exogámica puede surgir debido a dos mecanismos diferentes: (i) la interacción entre genotipo y ambiente cuando los individuos están adaptados a condiciones diferentes, de forma que, la población híbrida presentará combinaciones genotípicas de alelos que pueden estar poco adaptados a cualquiera de los ambientes y (ii) en las dos poblaciones han evolucionado diferentes complejos de genes coadaptados por lo que la recombinación en la población híbrida dará lugar a nuevas combinaciones de alelos que son deletéreos al interrumpir complejos génicos (Frankham y col., 2002). Sin embargo, la probabilidad de depresión exogámica en el cruzamiento entre dos poblaciones de la misma especie es baja cuando estas presentan el mismo cariotipo, han estado aisladas menos de 500 años y ocupan

ambientes similares (Frankham y col., 2011). Por tanto, la probabilidad de que se produzca depresión exogámica como resultado de la siembra en el medio natural de una generación de semilla de *D. trunculus* obtenida en el criadero puede considerarse mínima. No obstante, dado que los marcadores microsatélite se consideran esencialmente neutros, para tener mayor certeza de la baja probabilidad de depresión exogámica se debería realizar un análisis molecular de la variación adaptativa, el cual es posible a través de diferentes estrategias entre las que se incluyen el mapeo de QTLs, el análisis de asociaciones marcador/ambiente, el análisis de genes candidatos, los escrutinios genómicos y los análisis de expresión génica (Vasemägi y Primmer, 2005; Perfectti y col., 2009). Independientemente de la probabilidad de depresión exogámica, los resultados obtenidos en los análisis de diferenciación genética ponen de manifiesto que la siembra de la semilla obtenida en criadero en el banco natural del que proceden los progenitores podría modificar la estructura de la población, aunque esto dependería de la relación entre la cantidad de semilla sembrada y el tamaño total de la población natural. Cabe destacar que el impacto sería menor si se utilizase para la repoblación semilla de los grupos T1 y T3, ya que el grado de diferenciación respecto al banco natural es menor. Aparte de la diferenciación genética observada entre algunos grupos de semilla y los reproductores y/o la población natural, también destaca la existencia de diferenciación genética significativa entre grupos de semilla. Así, los grupos T1, T2 y T3 mostraron valores significativos frente a T4, el único grupo de semilla sometido a preengorde en batea. Esto, junto a la detección de contribución diferencial significativa de progenitores, asignados bajo el criterio estricto, al grupo T4 sugiere la existencia de algún componente genético que influye en el crecimiento y/o supervivencia en batea. Sin embargo, para poder confirmar esta posibilidad son necesarios diseños experimentales adecuados.

Identification of four *Donax* species by PCR-RFLP analysis of cytochrome c oxidase subunit I (COI)



6.1. INTRODUCTION

Mollusk fisheries in coastal areas play a very important role in the European social-economical context, providing a significant source of employment and income. Furthermore, the consumption of seafood products is growing in some countries where these organisms are recognized as an important and healthy part of the human diet (Helm et al., 2004). This increase in consumption is leading to the appearance of commercial fraud by replacement of high-value species with cheaper ones having similar morphological characteristics. Because of this, verifying the authenticity of the species is essential to detect and avoid fraud. On the other hand, the identification and authentication of commercial food species is very important to achieve food traceability, to protect consumers rights and to accomplish other quality objectives, such as designation of origin.

Bivalves of the genus *Donax* are widespread on the exposed sandy beaches of tropical and temperate coasts (Ansell, 1983), and they are commercially exploited in many European countries. Four *Donax* species, *D. semistriatus*, *D. trunculus*, *D. variegatus* and *D. vittatus*, are common along the Mediterranean and Atlantic coasts and live sympatrically in parts of the European coast, such as in Portugal (Rufino et al., 2010) and Spain (Salas et al., 2001). Although *Donax* species can be distinguished by their morphological traits, the species identification based on these characters is unreliable and it may be difficult for non-specialist to apply. Furthermore, specimens without shells, processed products or larval and juvenile forms are morphologically unidentifiable. However, molecular and biochemical techniques could allow their identification independently of their size or condition.

DNA methods based on polymerase chain reaction (PCR) amplification have been successfully used to authenticate fish and seafood species due to their reliability and reproducibility (Bossier, 1999). One of these techniques is PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), which consists in the amplification of a DNA fragment, followed by restriction enzyme treatment and electrophoretic separation. Species-specific band profiles allow detecting variation at the DNA level without the necessity of costly DNA sequencing. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA (mtDNA) has been used to identify several seafood species, such as lobsters (García-Rodríguez et al., 2008), mussels (Fernández-Tajes et al., 2011) or oysters (Klinbunga et al., 2003). The accelerated evolutionary rate of mtDNA, which facilitates to find sequence variation in closely related species (Pereira et al., 2008), and its high copy

numbers inside cells (Mackie et al., 1999), which aids amplification with low or degraded material, makes mtDNA a good candidate for searching species-specific molecular markers.

The aim of this study is to differentiate four species of the genus *Donax* using PCR-RFLPs of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) region.

6.2. MATERIAL AND METHODS

Specimens of *D. trunculus* were collected from O Barqueiro in northwest Spain (Atlantic Coast). Samples of *D. semistriatus*, *D. variegatus* and *D. vittatus* were captured off Lota beach (Vila Real de Santo Antonio) in south Portuguese coast. These specimens were identified by their morphological characteristics according to Macedo et al. (1999) and Tebble (1966). DNA was extracted from ethanol-preserved foot according to the Chelex-100™ (*Sigma-Aldrich, USA*) based method developed by Walsh et al. (1991).

Initially we used primers designed by Folmer et al. (1994) (HCO2198 and LCO1490) to amplify the COI fragment. Based on the sequences obtained, we subsequently developed a degenerate primer pair that amplified effectively a COI fragment in four *Donax* species in order to develop species-specific PCR-RFLP.

PCR reactions were performed in a final volume of 25 µl containing 80 ng of genomic DNA, 0.2 mM of each dNTP, 2 mM of MgCl₂, 0.6 U of *Taq* DNA polymerase (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), 0.6 µM of each primer (HCO2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3' and LCO1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') and the buffer recommended by polymerase suppliers. The amplification process consisted in an initial denaturation step of 3 min at 94 °C, followed by 34 amplification cycles of 45 s at 94 °C, 45 s at 41 °C, 45 s at 72 °C, and a final extension step at 72 °C for 3 min. PCR products were migrated on a 2.0 % agarose gel electrophoresis. The gels were stained by immersion in 0.5 µg/mL ethidium bromide, visualized and recorded on a transilluminator Gel Doc XR Systems (Bio-Rad, Barcelona, Spain). Amplified products were sequenced on an ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at the Molecular Biology Unit of the University of A Coruña (Spain).

Nucleotide sequences from *Donax* species obtained were aligned using ClustalW (BioEdit software) (Hall, 1999) and two primers, COIDonax-F (5'-GAGTATAATRCGKACTGARYTRATAC-3') and COIDonax-R (5'-GTGAATRAATAAHACNGGRTCYCC-3'), were designed using Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000) and manually edited to introduce degenerate nucleotides. Both the amplification process and the reaction mixture were the same as used for HCO2198 and LCO1490 except for the MgCl₂ concentration that was 1.5 mM.

Restriction enzyme selection was performed after comparison of the restriction map of COI sequences obtained with the BioEdit program software (Hall, 1999). The PCR amplification product of the COI fragment was digested with *AluI*, *HaeIII* and *MspI* restriction endonucleases. The reaction was carried out in a 20 µL reaction volume containing 5 µL of PCR product, 5 U of restriction enzyme and 2 µL of the recommended buffer for each enzyme. For *MspI*, 0.01% of bovine serum albumin (BSA) was added to the final volume. The digestion mixture was incubated at 37 °C overnight. The reactions were stopped by adding 4 µL of loading buffer. Restriction fragments were loaded on 2.5 % agarose gels, stained with ethidium bromide (0.5 µg/mL) and visualized with a transilluminator Gel Doc XR Systems (Bio-Rad, Barcelona, Spain).

6.3. RESULTS AND DISCUSSION

In the recent years, there has been a growing interest in developing tools to check the correct identification and traceability of seafood products to protect the consumer, to avoid commercial fraud and to ensure composition and safety of commercial marine products. In this work, we developed molecular markers based on PCR amplification and posterior digestion with endonucleases of a fragment of the COI subunit.

When universal primers for COI were used, a fragment of approximately 710 bp, the expected length according to Folmer et al. (1994), was amplified in *D. semistriatus*, *D. trunculus*, *D. variegatus* and *D. vittatus*. No apparent size variation was observed among individuals of different species (Figure 6.1). In several cases, additional DNA bands of unexpected sizes were observed, as in other bivalves (Klinbunga et al. 2003), but their intensity was much lower than that of the main band. The PCR product of four individuals from each species was sequenced.

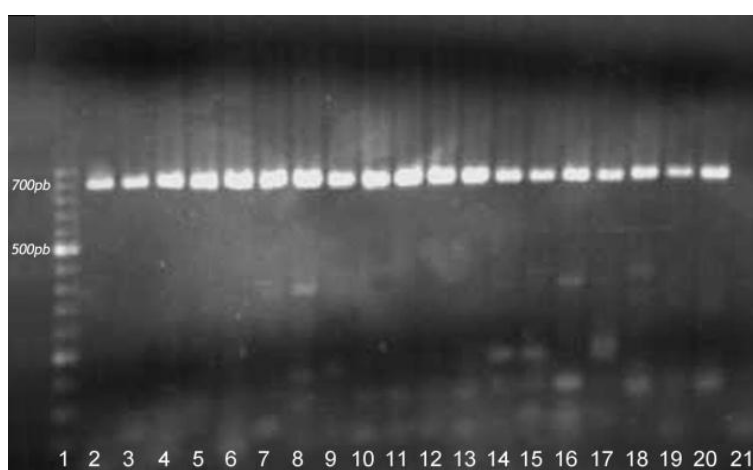


Figure 6.1. COI PCR products of *D. vittatus* (lanes 2-9), *D. variegatus* (lanes 10-13), *D. semistriatus* (lanes 14-17) and *D. trunculus* (lanes 18-20) using universal primers (LCO1490 and HCO2198). A 50-bp ladder was used as the DNA marker (lane 1). Negative control (lane 21)

Due to the appearance of nonspecific PCR bands that may interfere with the expected restriction pattern, we decided to design specific primers. The new primers (COIDonax-F and COIDonax-R) amplified a fragment of approximately 596 bp in individuals of all four species (Figure 6.2), and no nonspecific products were observed. In addition, the smaller size of the new amplicon could facilitate the amplification in degraded DNA, which is often the condition of samples obtained from markets.

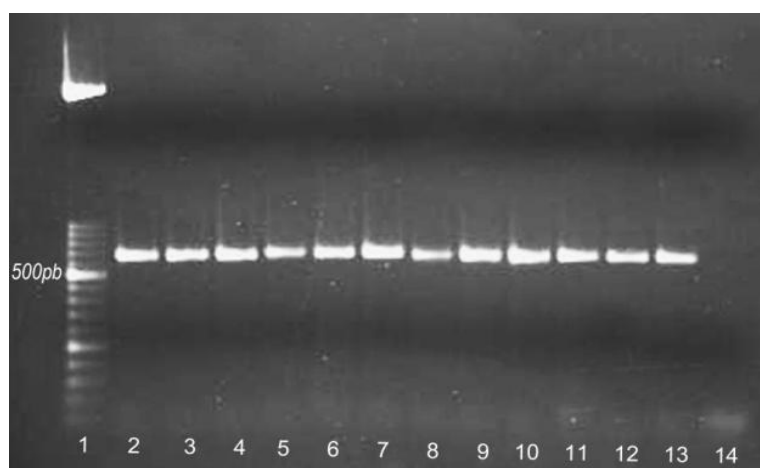


Figure 6.2. COI PCR products of *D. semistriatus* (lanes 2-4), *D. trunculus* (lanes 5-7), *D. variegatus* (lanes 8-10) and *D. vittatus* (lanes 11-13) using degenerate primers (COIDonax-F and COIDonax-R). A 50-bp ladder was used as the DNA marker (lane 1). Negative control (lane 14)

The COI sequences were examined for species – specific restriction patterns, and three restriction endonucleases were selected for RFLP analysis: *AluI* (AG'CT), *HaeIII* (GG'CC) and *MspI* (C'CGG). These endonucleases have their recognition sequences in the four *Donax* species, and the inferred restriction fragment patterns are presented in Table 6.1.

Table 6.1. Expected fragment sizes from restriction digests of COI PCR product with *AluI*, *HaeIII* and *MspI*

Species	Endonuclease	Fragment size (bp)
<i>D. trunculus</i>	<i>AluI</i>	91, 505
<i>D. semistriatus</i>		24, 75, 142, 169, 186
<i>D. variegatus</i>		21, 274, 301
<i>D. vittatus</i>		18, 75, 91, 142, 270
<i>D. trunculus</i>	<i>HaeIII</i>	217, 379
<i>D. semistriatus</i>		15, 55, 83, 182, 261
<i>D. variegatus</i>		15, 28, 55, 88, 94, 156, 160
<i>D. vittatus</i>		13, 55, 80, 83, 169, 196
<i>D. trunculus</i>	<i>MspI</i>	15, 31, 170, 183, 201
<i>D. semistriatus</i>		100, 496
<i>D. variegatus</i>		31, 31, 87, 99, 152, 196
<i>D. vittatus</i>		166, 430

The digestion of the amplified products of the four species analyzed revealed the expected profiles (Figures 6.3, 6.4 and 6.5). These three endonucleases gave a characteristic pattern for each of the *Donax* species studied and in all cases allowed the unequivocal identification of the wedge clam species. Fragments smaller than 50 bp were not used for identification purposes since they did not provide additional discrimination power and might be difficult to visualize. Intraspecific polymorphism in the PCR-RFLP pattern of the COI region was absent among analyzed individuals for the four species studied, and restriction patterns obtained with each of the three endonucleases were reproducible.

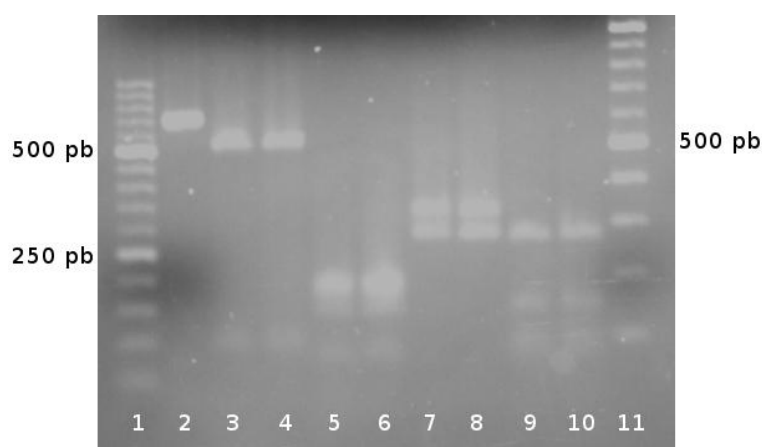


Figure 6.3. Restriction analysis of the COI PCR products of *D. trunculus* (lanes 3, 4), *D. semistriatus* (lanes 5, 6), *D. variegatus* (lanes 7, 8) and *D. vittatus* (lanes 9, 10) with *Alul*. Lanes 1, 2 and 11 are a 50-bp DNA marker, a undigested COI product and a 100-bp DNA marker, respectively

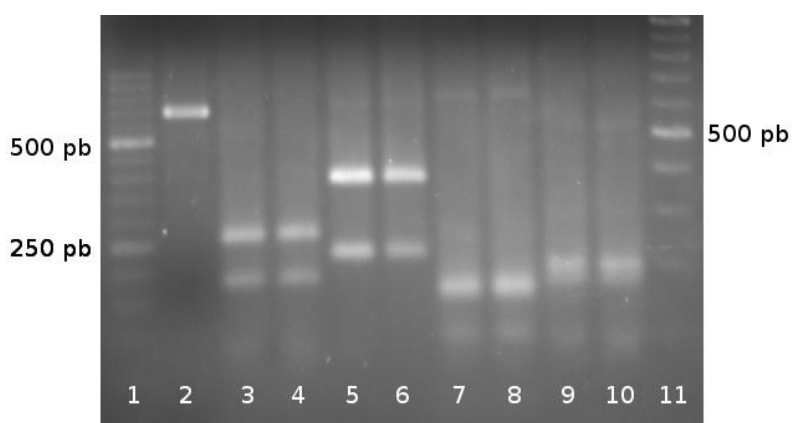


Figure 6.4. Restriction analysis of the COI PCR products of *D. semistriatus* (lanes 3, 4), *D. trunculus* (lanes 5, 6), *D. variegatus* (lanes 7, 8) and *D. vittatus* (lanes 9, 10) with *HaeIII*. Lanes 1, 2 and 11 are a 50-bp DNA marker, a undigested COI product and a 100-bp DNA marker, respectively

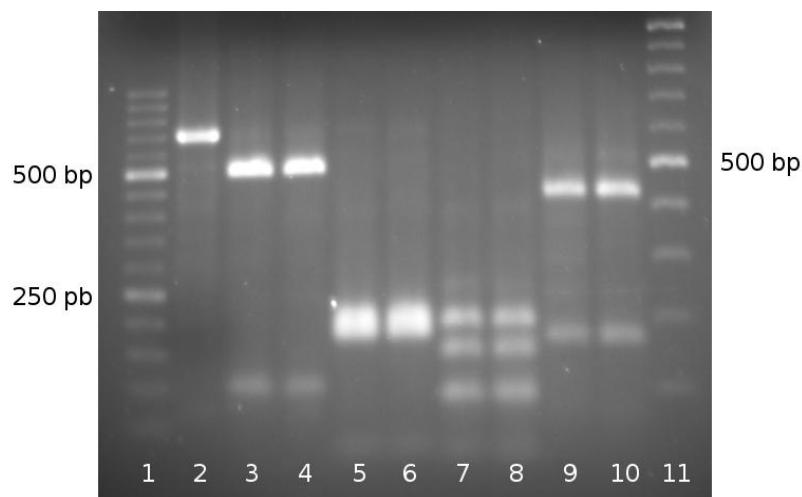


Figure 6.5. Restriction analysis of the COI PCR products of *D. semistriatus* (lanes 3, 4), *D. trunculus* (lanes 5, 6), *D. variegatus* (lanes 7, 8) and *D. vittatus* (lanes 9, 10) with *MspI*. Lanes 1, 2 and 11 are a 50-bp DNA marker, a undigested COI product and a 100-bp DNA marker, respectively

Most of the strategies used for species identification are based on the polymerase chain reaction (Bossier, 1999) due to its simplicity, sensitivity and reliability. Several protocols that involve PCR amplification of different regions have been developed to identify bivalve species with commercial value, such as clams (Fernández et al., 2001) cockles (Freire et al., 2005; Freire et al., 2011), mussels (Santacilara et al., 2006; Fernández-Tajes et al., 2011), razor clams (Fernández-Tajes and Méndez, 2007; Freire et al., 2008) or scallops (López-Piñón et al., 2002). In the same line of research, a technique to differentiate *Donax* species based on PCR amplification of 5S rDNA was carried out by Pereira et al. (2012). However, this method only allows differentiating *D. trunculus* and *D. variegatus* from the remaining *Donax* species, whereas the markers described in the present study are capable to discriminate among the four *Donax* species.

PCR-RFLPs analysis is a widely used tool in distinguishing species of different taxonomic groups because it is a cheap and quick method to detect interspecific variation at the DNA sequence level. The potential disadvantage of this technique is the possible existence of intraspecific variability; that is, variation at a particular restriction target site within a species (Mackie et al., 1999). These mutations can result in the gain or loss of restriction fragments and provide misleading results (Pereira et al., 2008). However, the use of the COI gene minimizes this possibility due to the low levels of intraspecific polymorphism in marine bivalves (Hare et al., 2000).

Nevertheless, *D. trunculus* shows doubly uniparental inheritance (DUI) (Theologidis et al., 2008) an unusual mode of mtDNA inheritance, which has been observed in some bivalves, in which two mtDNA types exist and show different transmission routes. One type is transmitted through eggs (F-type) to both female and male offspring and another through sperm (M-type) only to male offspring. In heteroplasmic males, the F-type is the main mtDNA in somatic tissues, while M-type occurs at a much higher level in gonads (Stewart et al., 1995; Sutherland et al., 1998). The presence of this biparental transmission can affect species identification. To overcome this problem, DNA was extracted from muscle tissue in males and females, where F-type is predominant. This same strategy has been used in several studies of mussel species that also show DUI (Westfall et al., 2010; Fernández-Tajes et al., 2011). Furthermore, PCR-RFLPs assays based on several restriction enzymes can be integrated to make the correct taxonomic assessment and to confirm the species identity. In this study, four *Donax* species were differentiated from each other based on the species-specific restriction patterns using any one of the three enzymes (*AluI*, *HaeIII* or *MspI*). However, patterns obtained with *AluI* and *MspI* are more easily interpreted.

The results obtained in current study corroborate the usefulness of the COI region for species identification. Markers based on this mitochondrial region are one of the most employed markers in this field since Hebert et al. (2003) proposed it for DNA barcoding. Furthermore, its easy amplification using universal primers (Folmer et al., 1994) is one important advantage of gene COI. In bivalves, the use of this region has been reported for the discrimination of different species with commercial value, such as mussels (Therriault et al., 2004; Fernández-Tajes et al., 2011), oysters (Boudry et al., 1998; Klinbunga et al., 2003; Yu et al., 2003; Liu et al., 2011) or scallops (Feng et al., 2011).

The PCR-RFLPs identified in the present work provide a simple, robust, reliable and inexpensive approach that in only two steps, PCR amplification of COI region followed by RFLP analysis with *AluI*, *HaeIII* or *MspI* endonucleases and allow differentiating four *Donax* species. This procedure can be used to prevent commercial fraud and to increase food traceability.

CONCLUSIONS



1. The construction of two microsatellite enriched libraries allowed the isolation of the first microsatellite markers in *D. trunculus*. A total of 19 microsatellite loci were characterized in this study.
2. Three multiplex PCRs were optimized to amplify at the same time 4 to 7 loci in order to facilitate microsatellite genotyping and to reduce cost and analysis time.
3. Seventeen localities from the Iberian Peninsula analyzed with microsatellite markers displayed similar levels of genetic diversity. These levels are similar to or lower than those observed for other mollusk species in the same area.
4. Genetic differentiation estimates obtained using microsatellites showed the existence of genetic structure in Iberian Peninsula. Three groups were identified: one composed of localities from Atlantic coast, other comprising Fuengirola (FU) locality, and a third one composed of the rest of Mediterranean localities.
5. The analysis of F and M mitochondrial lineages for CitB gene indicated higher nucleotide diversity in M type. Neutrality tests suggested that selective constraint is more relaxed in M genome.
6. The mitochondrial genes analyzed (F and M type in CitB and COI) showed the existence of genetic differentiation between the Iberian Peninsula localities studied. Two groups were identified: one composed of Atlantic localities and Fuengirola (FU) and other comprising the rest of Mediterranean localities.
7. Mitochondrial markers did not detect the genetic differentiation observed for Fuengirola (FU) and the Atlantic localities with microsatellites. This discrepancy is probably related to a higher statistical power to reveal population divergence of the cluster of microsatellites employed.
8. Paternity assignment showed a reduction higher than 75% of the effective population size of the breeders. This reduction can be attributed to unequal contribution of breeders and it would represent an increase of inbreeding per generation lower than 5%. This increase would allow the conservation of low frequency alleles.

9. The breeder stock used in hatchery was a representative sample of the natural bed from where they came. However, the seed obtained differed significantly from breeders and T2 and T4 groups were also different from the natural bed. The use of this seed in restoration may cause changes in the genetic pool of restocked populations.
10. PCR-RFLPs of mitochondrial COI gene developed in this work allowed to identify four *Donax* species (*D. semistriatus*, *D. trunculus*, *D. variegatus* and *D. vittatus*).

BIBLIOGRAFÍA



- A**bdelkrim J, Robertson BC, Stanton JA, Gemmell NJ (2009) Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *Biotechniques* **46**, 185-192.
- Allendorf FW, England PR, Luikart G, Ritchie PA, Ryman N (2008) Genetic effects of harvest on wild animal populations. *Trends in Ecology & Evolution* **23**, 327-337.
- Allendorf FW, Luikart G, Aitken SN (2013) *Conservation and the genetics of populations* (2nd edition) Wiley-Blackwell Publishing, West Sussex, UK.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410.
- Amos W, Balmford A (2001) When does conservation genetics matter? *Heredity* **87**, 257-265.
- An HS, Kim EM, Park JY (2009) Isolation and characterization of microsatellite markers for the clam *Ruditapes philippinarum* and cross-species amplification with the clam *Ruditapes variegata*. *Conservation Genetics* **10**, 1821-1823.
- Ansell AD (1983) The biology of the genus *Donax*. En: McLachlan A y Erasmus T (eds) *Sandy beaches as ecosystems*. Junk, The Hague, pp. 607-636.
- Ansell AD, Bodoy A (1979) Comparison of events in the seasonal cycle of *Donax vittatus* and *D. trunculus* in European waters. En: Naylor E y Hartnoll RG (eds) *Cyclic phenomena in marine plants and animals*. Pergamon Press, New York, pp. 191-197.
- Aranishi F (2006) A novel mitochondrial intergenic spacer reflecting population structure of Pacific oyster. *Journal of Applied Genetics* **47**, 119-123.
- Arias A, Freire R, Méndez J, Insua A (2010) Isolation and characterization of microsatellite markers in the queen scallop *Aequipecten opercularis* and their application to a population genetic study. *Aquatic Living Resources* **23**, 199-207.
- Arias A, Freire R, Pablo De La Roche J, Román G, Méndez J, Insua A (2011) Identification, inheritance, and variation of microsatellite markers in the black scallop *Mimachlamys varia*. *Biochemical Genetics* **49**, 139-152.
- Arias-Pérez A, Fernández-Tajes J, Gaspar MB, Méndez J (2012) Isolation of microsatellite markers and analysis of genetic diversity among east Atlantic populations of the sword razor shell *Ensis siliqua*: A tool for population management. *Biochemical Genetics* **50**, 397-415.
- Arif IA, Khan HA (2009) Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals:

a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation* **32**, 9-17.

Astaneï I, Gosling E, Wilson J, Powell E (2005) Genetic variability and phylogeography of the invasive zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Molecular Ecology* **14**, 1655-1666.

Avise JC (2004) *Molecular markers, natural history and evolution* (2nd Edition) Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Avise JC, Arnold J, Ball RM, *et al.* (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**, 489-522.

Baker P, Austin JD, Bowen BW, Baker SM (2008) Range-wide population structure and history of the northern quahog (*Merceneria merceneria*) inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Ices Journal of Marine Science* **65**, 155-163.

Ballard JWO, Whitlock MC (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* **13**, 729-744.

Bandelt HJ, Forster P, Rohl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **16**, 37-48.

Bartley DM, Kent DB, Drawbridge MA (1995) Conservation of genetic diversity in a white seabass hatchery enhancement program in southern California. *Uses and Effects of Cultured Fishes in Aquatic Ecosystems* **15**, 249-258.

Bayed A (1998) Variabilité de la croissance de *Donax trunculus* sur le littoral marocain. In: *Dynamique des populations marine* (ed. Lleonart J), pp. 11-23. CIHEAM, Zaragoza.

Bayed A, Guillou J (1985) Contribution à l'étude des populations du genre *Donax*: la population de *Donax trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia) de Mehdiya (Maroc). *Annales de l'Institut Oceanographique* **61**, 139-147.

Beaumont AR, Pether SMJ (1996) Allozyme variation and gene flow between cockle *Cerastoderma edule* populations in southern United Kingdom. *Fisheries Research* **28**, 263-275.

Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. *Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier*.

- Belkhir K, Castric V, Bonhomme F (2002) IDENTIX, a software to test for relatedness in a population using permutation methods. *Molecular Ecology Notes* **2**, 611-614.
- Bensasson D, Zhang DX, Hartl DL, Hewitt GM (2001) Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 314-321.
- Benson G (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research* **27**, 573-580.
- Bertorelle G, Slatkin M (1995) The number of segregating sites in expanding human populations, with implications for estimates of demographic parameters. *Molecular Biology and Evolution* **12**, 887-892.
- Bezuidenhout K, Nel R, Hauser L (2014) Demographic history, marker variability and genetic differentiation in sandy beach fauna: What is the meaning of low FST's? *Estuarine Coastal and Shelf Science* **150**, 120-124.
- Billote N, Lagoda P, Risterucci A, Baurens F (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* **54**, 277-288.
- Boore JL (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* **27**, 1767-1780.
- Borgo R, Souty-Grosset C, Bouchon D, Gomot L (1996) PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification of snail meat species. *Journal of Food Science* **61**, 1-4.
- Borrell YJ (2002) *Loci* microsatélites como marcadores genéticos para la mejora del rendimiento en acuicultura de especies marinas. Tesis doctoral, Universidad de Oviedo.
- Borrell YJ, Arias-Pérez A, Freire R, Valdés A, Sánchez JA, Méndez J, Martínez D, López J, Carleos C, Blanco G, Insua AM (2014) Microsatellites and multiplex PCRs for assessing aquaculture practices of the grooved carpet shell *Ruditapes decussatus* in Spain. *Aquaculture* **426**, 49-59.
- Borrell YJ, Gallego V, García-Fernández C, Mazzeo I, Pérez L, Asturiano JF, Carleos CE, Vázquez E, Sánchez JA, Blanco G (2011) Assessment of parental contributions to fast- and slow-growing progenies in the sea bream *Sparus aurata* L. using a new multiplex PCR. *Aquaculture* **314**, 58-65.
- Borrell YJ, Piñera JA, Sánchez-Prado JA, Blanco G (2012) Mitochondrial DNA and microsatellite genetic differentiation in the European anchovy *Engraulis*

- encrasicolus* L. *Ices Journal of Marine Science* **69**, 1357-1371.
- Borsa P, Zainuri M, Delay B (1991) Heterozygote deficiency and population structure in the bivalve *Ruditapes decussatus*. *Heredity* **66**, 1-8.
- Bossart JL, Prowell DP (1998) Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons and new directions. *Trends in Ecology & Evolution* **13**, 202-206.
- Bossier P (1999) Authentication of seafood products by DNA patterns. *Journal of Food Science* **64**, 189-193.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* **32**, 314-331.
- Bottero MT, Lomonaco S (2006) Biomolecular technique in identification and characterization of food components. En: Wood CR (ed) *Frontiers in DNA Research*. Nova Science Publishers, New York, pp. 137-169.
- Boudry P, Collet B, Cornette F, Hervouet V, Bonhomme F (2002) High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. *Aquaculture* **204**, 283-296.
- Boudry P, Heurtebise S, Collet B, Cornette F, Gerard A (1998) Differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **226**, 279-291.
- Bowden KF (1975) Oceanic and estuarine mixing processes. En: Riley JP y Skirrow G (eds) *Chemical Oceanography*. Academic Press, London, pp. 1-41.
- Boyle EE, Etter RJ (2013) Heteroplasmy in a deep-sea protobranch bivalve suggests an ancient origin of doubly uniparental inheritance of mitochondria in Bivalvia. *Marine Biology* **160**, 413-422.
- Breton S, Beaupre HD, Stewart DT, Piontkivska H, Karmakar M, Bogan AE, Blier PU, Hoeh WR (2009) Comparative mitochondrial genomics of freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida) with doubly uniparental inheritance of mtDNA: gender-specific open reading frames and putative origins of replication. *Genetics* **183**, 1575-1589.
- Brookfield JFY (1996) A simple new method for estimating null allele frequency from

- heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* **5**, 453-455.
- Brown WM, George M, Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 1967-1971.
- Brown AC, McLachlan A (1990) *Ecology of sandy shores*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Bryden HL, Candela J, Kinder TH (1994) Exchange through the strait of Gibraltar. *Progress in Oceanography* **33**, 201-248.
- Bucquoy E, Dautzenberg P, Dolfus G (1898) *Les mollusques marins du Rousillon. Pelecypodes*. Bailliére and Fils, Paris. Tomo 2.
- Burzynski A, Zbawicka M, Skibinski DOF, Wenne R (2003) Evidence for recombination of mtDNA in the marine mussel *Mytilus trossulus* from the Baltic. *Molecular Biology and Evolution* **20**, 388-392.
- Butler JM, Ruitberg CM, Vallone PM (2001) Capillary electrophoresis as a tool for optimization of multiplex PCR reactions. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **369**, 200-205.
- C**amara MD, Vadopalas B (2009) Genetic aspects of restoring Olympia oysters and other native bivalves: balancing the need for action, good intentions, and the risks of making things worse. *Journal of Shellfish Research* **28**, 121-145.
- Carstensen D, Laudien J, Leese F, Arntz W, Held C (2009) Genetic variability, shell and sperm morphology suggest that the surf clams *Donax marincovichii* and *D. obesulus* are one species. *Journal of Molluscan Studies* **75**, 381-390.
- Castro J, Bouza C, Presa P, Pino-Querido A, Riaza A, Ferreiro I, Sánchez L, Martínez P (2004) Potential sources of error in parentage assessment of turbot (*Scophthalmus maximus*) using microsatellite loci. *Aquaculture* **242**, 119-135.
- Cavalli-Sforza LI, Edwards AWF (1967) Phylogenetic analysis models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics* **19**, 233-&.
- Cerda H, Koppen G (1998) DNA degradation in chilled fresh chicken studied with the neutral comet assay. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology* **207**, 22-25.
- Chabane K, Ablett GA, Cordeiro GM, Valkoun J, Henry RJ (2005) EST versus genomic

- derived microsatellite markers for genotyping wild and cultivated barley. *Genetic Resources and Crop Evolution* **52**, 903-909.
- Chacón G, Arias-Pérez A, Méndez J, Insua A, Freire R (2013) Development and multiplex PCR amplification of microsatellite markers in the commercial clam *Venerupis rhomboides* (Mollusca:Bivalvia). *Molecular Biology Reports* **40**, 1625-1630.
- Chagné D, Chaumeil P, Ramboer A, Colloda C, Guevara A, Cervera MT, Vendramin GG, Garcia V, Frigerio JM, Echt C, Richardson T, Plomion C (2004) Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. *Theoretical and Applied Genetics* **109**, 1204-1214.
- Chakraborty R, Meagher TR, Smouse PE (1988) Parentage analysis with genetic markers in natural populations. I. The expected proportion of offspring with unambiguous paternity. *Genetics* **118**, 527-536.
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT (1988) Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research* **16**, 11141-11156.
- Chambers GK, MacAvoy ES (2000) Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology B* **126**, 455-476.
- Chapuis MP, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 621-631.
- Charlesworth B, Charlesworth D (1999) The genetic basis of inbreeding depression. *Genetical Research* **74**, 329-340.
- Chevassus B (1989) Genetic aspects of the foundation of hatchery populations for stocking use. *Bulletin Francais De La Peche Et De La Pisciculture*, 146-168.
- Chícharo L, Chícharo A, Gaspar M, Alves F, Regala J (2002) Ecological characterization of dredged and non-dredged bivalve fishing areas off south Portugal. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **82**, 41-50.
- Chikuni K, Ozutsumi K, Koishikawa T, Kato S (1990) Species identification of cooked meats by DNA hybridization assay. *Meat Science* **27**, 119-128.
- Chistiakov DA, Hellemans B, Volckaert FAM (2006) Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* **255**, 1-29.

- Cho ES, Lung CG, Sohn SG, Kim CW, Han SJ (2007) Population genetic structure of the ark shell *Scapharca broughtonii* Schrenck from Korea, China, and Russia based on COI gene sequences. *Marine Biotechnology* **9**, 203-216.
- Civera T (2003) Species identification and safety of fish products. *Veterinary Research Communications* **27**, 481-489.
- Cornet M, Soulard C (1990) Chromosome number and karyotype of *Donax trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia, Tellinacea). *Genetica* **82**, 93-97.
- Couceiro L, Barreiro R, Ruiz JM, Sotka EE (2007) Genetic isolation by distance among populations of the netted dog whelk *Nassarius reticulatus* (L.) along the European Atlantic coastline. *Journal of Heredity* **98**, 603-610.
- Coulibaly I, Gharbi K, Danzmann RG, Yao J, Rexroad CE (2005) Characterization and comparison of microsatellites derived from repeat-enriched libraries and expressed sequence tags. *Animal Genetics* **36**, 309-315.
- Crow JF, Kimura M (1970) *An Introduction to Population Genetics Theory* Harper and Row, New York.
- Cruz F, Pérez M, Presa P (2005) Distribution and abundance of microsatellites in the genome of bivalves. *Gene* **346**, 241-247.
- Curole JP, Kocher TD (2005) Evolution of a unique mitotype-specific protein-coding extension of the cytochrome c oxidase II gene in freshwater mussels (Bivalvia : Unionoida). *Journal of Molecular Evolution* **61**, 381-389.
- D**aemen E, Cross T, Ollevier F, Volckaert FAM (2001) Analysis of the genetic structure of European eel (*Anguilla Anguilla*) using microsatellite DNA and mtDNA markers. *Marine Biology* **139**, 755-764
- Dahlgren TG, Weinberg JR, Halanych KM (2000) Phylogeography of the ocean quahog (*Arctica islandica*): influences of paleoclimate on genetic diversity and species range. *Marine Biology* **137**, 487-495.
- Dai P, Wang H, Liu B (2014) Assessment of parental contribution and effective population size from a 3x3 diallel cross of clam *Meretrix meretrix*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* **32**, 306-315.
- Dakin EE, Avise JC (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* **93**, 504-509.

- De la Huz R, Lastra M, Lopez J (2002) The influence of sediment grain size on burrowing, growth and metabolism of *Donax trunculus* L. (Bivalvia : Donacidae). *Journal of Sea Research* **47**, 85-95.
- DeBoer TS, Naguit MRA, Erdmann MV, Ablan-Lagman MC, Ambariyanto, Carpenter KE, Toha AHA, Barber PH (2014) Concordant phylogenetic patterns inferred from mitochondrial and microsatellite DNA in the giant clam *Tridacna crocea*. *Bulletin of Marine Science* **90**, 301-329.
- DeWoody JA (2005) Molecular approaches to the study of parentage, relatedness, and fitness: practical applications for wild animals. *Journal of Wildlife Management* **69**, 1400 - 1418.
- Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 3166-3170.
- Diz AP, Presa P (2008) Regional patterns of microsatellite variation in *Mytilus galloprovincialis* from the Iberian Peninsula. *Marine Biology* **154**, 277-286.
- Dong S, Kong J, Zhang T, Meng X, Wang R (2006) Parentage determination of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) based on microsatellite DNA markers. *Aquaculture* **258**, 283-288.
- Duggen S, Hoernle K, Van den Bogaard P, Rupke L, Morgan JP (2003) Deep roots of the Messinian salinity crisis. *Nature* **422**, 602-606.
- Duran S, Palacin C, Becerro MA, Turon X, Giribet G (2004) Genetic diversity and population structure of the commercially harvested sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea). *Molecular Ecology* **13**, 3317-3328.
- Eackles MS, King TL (2002) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Lampsilis abrupta* (Bivalvia : Unionidae) and cross-species amplification within the genus. *Molecular Ecology Notes* **2**, 559-562.
- Edwards KJ, Barker JHA, Daly A, Jones C, Karp A (1996) Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *Biotechniques* **20**, 758-760.
- Ellegren H (2000) Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics* **16**, 551-558.

- English LJ, Maguire GB, Ward RD (2000) Genetic variation of wild and hatchery populations of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Australia. *Aquaculture* **187**, 283-298.
- Espiñeira M, González-Lavin N, Vieites JM, Santaclara FJ (2009) Development of a method for the genetic identification of commercial bivalve species based on mitochondrial 18S rRNA sequences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 495-502.
- Estoup A, Jarne P, Cornuet JM (2002) Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* **11**, 1591-1604.
- Estrada M, Vives F, Alcaraz M (1985) Life and productivity of the open sea. En: Margalef R (ed) *Key environment Western Mediterranean*. Pergamon Press, Oxford, pp. 148-197.
- Eujayl I, Sorrells ME, Baum M, Wolters P, Powell W (2002) Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **104**, 399-407.
- Evans B, Bartlett J, Sweijd N, Cook P, Elliott NG (2004) Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery produced abalone in Australia (*Haliotis rubra*) and South Africa (*Haliotis midae*). *Aquaculture* **233**, 109-127.
- Evans BS, Knauer J, Taylor JJU, Jerry DR (2006) Development and characterization of six new microsatellite markers for the silver- or gold-lipped pearl oyster, *Pinctada maxima* (Pteriidae). *Molecular Ecology Notes* **6**, 835-837.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* **1**, 47-50.
- F**alconer DS (1989) *Introduction to quantitative genetics*, (3rd edition). Longman, New York.
- Feldheim KA, Gruber SH, Ashley MV (2001) Population genetic structure of the lemon shark (*Negaprion brevirostris*) in the western Atlantic: DNA microsatellite variation. *Molecular Ecology* **10**, 295-303.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.

- Felsenstein J (1993) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. *Department of Genetics, University of Washington, Seattle*.
- Feng Y, Li Q, Kong L, Zheng X (2011) DNA barcoding and phylogenetic analysis of *Pectinidae* (Mollusca: Bivalvia) based on mitochondrial COI and 16S rRNA genes. *Molecular Biology Reports* **38**, 291-299.
- Ferguson A, Taggart JB, Prodohl PA, McMeel O, Thompson C, Stone C, McGinnity P, Hynes RA (1995) The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *Journal of Fish Biology* **47**, 103-126.
- Fernández A, García T, Asensio L, Rodríguez MA, González I, Hernández PE, Martín R (2001) PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region for identification of 3 clam species. *Journal of Food Science* **66**, 657-661.
- Fernández-Moreno M, Arias-Pérez A, Freire R, Méndez J (2008) Genetic analysis of *Aequipecten opercularis* and *Mimachlamys varia* (Bivalvia: Pectinidae) in several Atlantic and Mediterranean localities, revealed by mitochondrial PCR-RFLPs: a preliminary study. *Aquaculture Research* **39**, 474-481.
- Fernández-Tajes J, Longa A, García-Gil J, Chiu YW, Huang YS, Méndez J, Lee RS (2011) Alternative PCR-RFLP methods for mussel *Mytilus* species identification. *European Food Research and Technology* **233**, 791-796.
- Fernández-Tajes J, Méndez J (2007) Identification of the razor clam species *Ensis arcuatus*, *E. siliqua*, *E. directus*, *E. macha*, and *Solen marginatus* using PCR-RFLP analysis of the 5S rDNA region. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 7278-7282.
- Fisher C, Skibinski DOF (1990) Sex-biased mitochondrial DNA heteroplasmy in the marine mussel *Mytilus*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **242**, 149-156.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology* **3**, 294-299.
- Frankham R (1995) Effective population size ratios in wildlife: a review. *Genetical Research* **66**, 95-107.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to conservation genetics* Cambridge University Press, Cambridge.

- Frankham R, Ballou JD, Eldridge MDB, Lacy RC, Ralls K, Dudas M, Fenster CB (2011) Predicting the probability of outbreeding depression. *Conservation Biology* **25**, 465-475.
- Franklin IR (1980) Evolutionary change in small populations. En: Soulé ME y Wilcox BA (eds) *Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective*. Sinauer, Sunderland, pp. 135-149.
- Freire R, Arias A, Méndez J, Insua A (2011) Identification of European commercial cockles (*Cerastoderma edule* and *C. glaucum*) by species-specific PCR amplification of the ribosomal DNA ITS region. *European Food Research and Technology* **232**, 83-86.
- Freire R, Fernández-Tajes J, Méndez J (2008) Identification of razor clams *Ensis arcuatus* and *Ensis siliqua* by PCR-RFLP analysis of ITS1 region. *Fisheries Science* **74**, 511-515.
- Freire R, Insua A, Méndez J (2005) *Cerastoderma glaucum* 5S ribosomal DNA: characterization of the repeat unit, divergence with respect to *Cerastoderma edule*, and PCR-RFLPs for the identification of both cockles. *Genome* **48**, 427-442.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**, 915-925.
- G**affney PM (1990) Enzyme heterozygosity, growth rate, and viability in *Mytilus edulis*: another look. *Evolution* **44**, 204-210.
- Gaffney PM (2006) The role of genetics in shellfish restoration. *Aquatic Living Resources* **19**, 277-282.
- Gaither MR, Toonen RJ, Robertson DR, Planes S, Bowen BW (2010) Genetic evaluation of marine biogeographical barriers: perspectives from two widespread Indo-Pacific snappers (*Lutjanus kasmira* and *Lutjanus fulvus*). *Journal of Biogeography* **37**, 133-147.
- Galili T (2010) Post hoc analysis for Friedman's Test (R Code). R - statistics blog posted on February 22, 2010. Accessed on February 13, 2015. Disponible en <http://www.r-statistics.com/2010/02/post-hoc-analysis-for-friedmans-test-r-code/>.
- Galindo-Sánchez CE, Gaffney PM, Pérez-Rostro CI, De la Rosa-Vélez J, Candela J, Cruz P (2008) Assessment of genetic diversity on the eastern oyster *Crassostrea*

- virginica* in Veracruz, Mexico using microsatellite markers. *Journal of Shellfish Research* **27**, 721-727.
- Galtier N, Nabholz B, Glemin S, Hurst GDD (2009) Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* **18**, 4541-4550.
- García-Merchán HV, Robainas-Barcia A, Abelló P, Macpherson E, Palero F, García-Rodríguez M, Gil de Sola L, Pasucal M (2012) Phylogeographic patterns of decapod crustaceans at the Atlantic-Mediterranean transition. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **62**, 664-672.
- García-Rodríguez FJ, Ponce-Díaz G, Muñoz-García I, González-Armas R, Pérez-Enríquez R (2008) Mitochondrial DNA markers to identify commercial spiny lobster species (*Panulirus* spp.) from the Pacific coast of Mexico: an application on phyllosoma larvae. *Fishery Bulletin* **106**, 204-212.
- Gardeström J, Pereyra RT, André C (2008) Characterization of six microsatellite loci in the Baltic blue mussel *Mytilus trossulus* and cross-species amplification in North Sea *Mytilus edulis*. *Conservation Genetics* **9**, 1003-1005.
- Garrido-Ramos MA, Stewart DT, Sutherland BW, Zouros E (1998) The distribution of male-transmitted and female-transmitted mitochondrial DNA types in somatic tissues of blue mussels: Implications for the operation of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genome* **41**, 818-824.
- Gaspar MB, Ferreira R, Monteiro CC (1999) Growth and reproductive cycle of *Donax trunculus* L., (Mollusca : Bivalvia) off Faro, southern Portugal. *Fisheries Research* **41**, 309-316.
- Geist J (2010) Strategies for the conservation of endangered freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera* L.): a synthesis of Conservation Genetics and Ecology. *Hydrobiologia* **644**, 69-88.
- Giantsis IA, Abatzopoulos TJ, Angelidis P, Apostolidis AP (2014) Mitochondrial Control Region variability in *Mytilus galloprovincialis* populations from the Central-Eastern Mediterranean Sea. *International Journal of Molecular Sciences* **15**, 11614-11625.
- Glynn F, Houghton JDR, Bastian T, Doyle TK, Fuentes V, Lille MKS, Provan J (2015) High-resolution genetic analysis reveals extensive gene flow within the jellyfish *Pelagia noctiluca* (Scyphozoa) in the North Atlantic and Mediterranean sea. *Biological Journal of the Linnean Society* DOI: **10.1111/bj.12654**.

- González-Tizón A, Martínez-Lage A, Mariñas L, Freire R, Cornudella L, Méndez J (1998) Cytogenetic characterization of *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia). *Cytogenetics and Cell Genetics* **81**, 109-109.
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. *Institut d'Ecologie, Université de Lausanne, Dorigny, Switzerland*.
- Gupta PK, Rustgi S, Sharma S, et al. (2003) Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Molecular Genetics and Genomics* **270**, 315-323.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95-98.
- Hamilton MB, Pincus EL, Di Fiore A, Fleischer RC (1999) Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *Biotechniques* **27**, 500-507.
- Hansen MM, Mensberg KLD, Berg S (1999) Postglacial recolonization patterns and genetic relationships among whitefish (*Coregonus* sp.) populations in Denmark, inferred from mitochondrial DNA and microsatellite markers. *Molecular Ecology* **8**, 239-252.
- Hare MP, Palumbi SR, Butman CA (2000) Single-step species identification of bivalve larvae using multiplex polymerase chain reaction. *Marine Biology* **137**, 953-961.
- Harris LN, Howland KL, Kowalchuk MW, Bajno R, Lindsay MM, Taylor EB (2013) Microsatellite and mtDNA analysis of lake trout, *Salvelinus namaycush*, from Great Bear Lake, Northwest Territories: impacts of historical and contemporary evolutionary forces on Arctic ecosystems. *Ecology and Evolution* **3**, 145-161.
- Hartl DL, Clark AG (2007) *Principles of population genetics*. (4th edition). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Hauser L, Adcock GJ, Smith PJ, Ramirez JHB, Carvalho GR (2002) Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 11742-11747.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, de Waard JR (2003) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of*

the Royal Society B-Biological Sciences **270**, S96-S99.

Hedgecock D (1994) Does variance in reproductive success limit effective population size of marine organisms? En: Beaumont A (ed) *Genetics and evolution of aquatic organisms*. Chapman and Hall, London, pp. 122-134.

Hedgecock D, Launey S, Pudovkin AI, Naciri Y, Lapègue S, Bonhomme F (2007) Small effective number of parents (N_b) inferred for a naturally spawned cohort of juvenile European flat oysters *Ostrea edulis*. *Marine Biology* **150**, 1173-1182.

Hedgecock D, Li G, Hubert S, Bucklin K, Ribes V (2004) Widespread null alleles and poor cross-species amplification of microsatellite DNA loci cloned from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research* **23**, 379-385.

Hedgecock D, Pudovkin AI (2011) Sweepstakes reproductive success in highly fecund marine fish and shellfish: a review and commentary. *Bulletin of Marine Science* **87**, 971-1002.

Hedgecock D, Sly F (1990) Genetic drift and effective population sizes of hatchery-propagated stocks of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* **88**, 21-38.

Hedrick PW (2000) *Genetics of populations* (2nd Edition) Jones and Bartlett Publishers, Sudbury.

Helm MM, Bourne, N., Lovatelli, A. (comp./ed.) (2004) *Hatchery culture of bivalves. A practical manual*. FAO Fisheries Technical Paper, Rome.

Helm MM, Bourne N (2006) *Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico*. Lovatelli A (ed), FAO, Roma.

Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH (1997) Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* **23**, 504-511.

Hoeh WR, Stewart DT, Guttman SI (2002) High fidelity of mitochondrial genome transmission under the doubly uniparental mode of inheritance in freshwater mussels (Bivalvia : Unionoidea). *Evolution* **56**, 2252-2261.

Hoeh WR, Stewart DT, Sutherland BW, Zouros E (1996) Cytochrome c oxidase sequence comparisons suggest an unusually high rate of mitochondrial DNA evolution in *Mytilus* (Mollusca: Bivalvia). *Molecular Biology and Evolution* **13**, 418-421.

Hoffman JI, Dasmahapatra KK, Amos W, *et al.* (2009) Contrasting patterns of genetic diversity at three different genetic markers in a marine mammal metapopulation.

Molecular Ecology **18**, 2961-2978.

Hollander M, Wolfe DA (1999) Nonparametric statistical methods. (2nd Edition) John Wiley & Sons., New York.

Holleley CE, Geerts PG (2009) Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. *Biotechniques* **46**, 511-517.

Hu JJ, Nakatani M, Mizuno K, Fujimura T (2004) Development and characterization of microsatellite markers in sweetpotato. *Breeding Science* **54**, 177-188.

Hutchison DW, Templeton AR (1999) Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: Inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* **53**, 1898-1914.

Huvet A, Lapégué S, Magoulas A, Boudry P (2000) Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of *Crassostrea angulata*, the Portuguese oyster endangered in Europe. *Conservation Genetics* **1**, 251-262.

Infante C, Manchado M (2007) Recursos genéticos de peces marinos de interés en acuicultura. En: Martínez P y Figueras A (eds) *Genética y Genómica en Acuicultura*. Publicaciones científicas y tecnológicas del Observatorio Español de Acuicultura, Madrid, pp. 23-64.

Jensen JL, Bohonak AJ, Kelley STC (2005) Isolation by distance, web service. *Bmc Genetics* **6**.

Jerry DR, Preston NP, Crocos PJ, Keys S, Meadows JRS, Li Y (2004) Parentage determination of Kuruma shrimp *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* using microsatellite markers (Bate). *Aquaculture* **235**, 237-247.

Jia M, Li J, Wang S (2010) Isolation and characterization of 18 polymorphic microsatellite loci from freshwater pearl mussel (*Cristaria plicata*). *Conservation Genetics* **11**, 1131-1133.

Johnson MS (2000) Measuring and interpreting genetic structure to minimize the genetic risks of translocations. *Aquaculture Research* **31**, 133-143.

Jones AG, Small CM, Paczolt KA, Ratterman NL (2010) A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resources* **10**, 6-30.

Jones DB, Zenger KR, Jerry DR (2011) In silico whole-genome EST analysis reveals

2322 novel microsatellites for the silver-lipped pearl oyster, *Pinctada maxima*. *Marine Genomics* **4**, 287-290.

Jukes TH, Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. En: Munro HN (ed) *Mammalian protein metabolism*. Academic press, Nueva York, pp. 21-123.

Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* **16**, 1099-1106.

Kalinowski ST, Wagner AP, Taper ML (2006) ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* **6**, 576-579.

Kang JH, Kim YK, Park JY, Noeh ES, Jeong JE, Lee YS, Choi TJ (2013) Development of microsatellite markers for a hard-shelled mussel, *Mytilus coruscus*, and cross-species transfer. *Genetics and Molecular Research* **12**, 4009-4017.

Karagoyozov L, Kalcheva ID, Chapman VM (1993) Construction of random small-insert genomic libraries enriched for simple sequence repeats. *Nucleic Acids Research* **21**, 3911-3912.

Karaket T, Poompuang S (2012) CERVUS vs. COLONY for successful parentage and sibship determinations in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* de Man. *Aquaculture* **324**, 307-311.

Karl SA, Toonen RJ, Grant WS, Bowen BW (2012) Common misconceptions in molecular ecology: echoes of the modern synthesis. *Molecular Ecology* **21**, 4171-4189.

Kenchington E (2003) The effects of fishing on species and genetic diversity. En: Sinclair M y Valdimarsson G (eds) *Responsible fisheries in the marine ecosystems*. CABI Publishing, Rome, pp. 25-40.

Kimura M, Crow JF (1964) Number of alleles that can be maintained in finite population. *Genetics* **49**, 725-&.

Kimura M, Ohta T (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**, 2868-2872.

Klinbunga S, Khamnamtong N, Tassanakajon A, Puanglarp N, Jarayabhand P, Yoosukh W (2003) Molecular genetic identification tools for three commercially

- cultured oysters (*Crassostrea belcheri*, *Crassostrea iredalei*, and *Saccostrea cucullata*) in Thailand. *Marine Biotechnology* **5**, 27-36.
- Krakau M, Jacobsen S, Jensen KT, Reise K (2012) The cockle *Cerastoderma edule* at Northeast Atlantic shores: genetic signatures of glacial refugia. *Marine Biology* **159**, 221-230.
- Krijgsman W, Langereis CG, Zachariasse WJ, Boccaletti M, Moratti G, Gelati R, Iaccarino S, Papani G, Villa G (1999) Late Neogene evolution of the Taza-Guercif Basin (Rifian Corridor, Morocco) and implications for the Messinian salinity crisis. *Marine Geology* **153**, 147-160.
- Kuparinen A, Merilä J (2007) Detecting and managing fisheries-induced evolution. *Trends in Ecology & Evolution* **22**, 652-659.
- Ladoukakis ED, Saavedra C, Magoulas A, Zouros E (2002) Mitochondrial DNA variation in a species with two mitochondrial genomes: the case of *Mytilus galloprovincialis* from the Atlantic, the Mediterranean and the Black Sea. *Molecular Ecology* **11**, 755-769.
- Ladoukakis ED, Zouros E (2001) Direct evidence for homologous recombination in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution* **18**, 1168-1175.
- Lafarga-de la Cruz F, Aguilar-Espinoza A, Gallardo-Escarate C (2015) Parentage assignment in hybrid abalones (*Haliotis rufescens* x *Haliotis discus hannai*) based on microsatellite DNA markers. *Aquaculture Research* **46**, 216-225.
- Lai Y, Sun F (2003) The relationship between microsatellite slippage mutation rate and the number of repeat unit. *Molecular Biology Evolution* **20**, 2123-2131.
- Lallias D, Boudry P, Lapegue S, King JW, Beaumont AR (2010a) Strategies for the retention of high genetic variability in European flat oyster (*Ostrea edulis*) restoration programmes. *Conservation Genetics* **11**, 1899-1910.
- Lallias D, Taris N, Boudry P, Bonhomme F, Lapegue S (2010b) Variance in the reproductive success of flat oyster *Ostrea edulis* L. assessed by parentage analyses in natural and experimental conditions. *Genetics Research* **92**, 175-187.
- Launey S, Ledu C, Boudry P, Bonhomme F, Naciri-Graven Y (2002) Geographic structure in the European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) as revealed by microsatellite polymorphism. *Journal of Heredity* **93**, 331-338.

- Law R (2007) Fisheries-induced evolution: present status and future directions. *Marine Ecology Progress Series* **335**, 271-277.
- Leberg PL, Firmin BD (2008) Role of inbreeding depression and purging in captive breeding and restoration programmes. *Molecular Ecology* **17**, 334-343.
- Lee HJE, Boulding EG (2009) Spatial and temporal population genetic structure of four northeastern Pacific littorinid gastropods: the effect of mode of larval development on variation at one mitochondrial and two nuclear DNA markers. *Molecular Ecology* **18**, 2165-2184.
- Lemay MA, Boulding EG (2009) Microsatellite pedigree analysis reveals high variance in reproductive success and reduced genetic diversity in hatchery-spawned northern abalone. *Aquaculture* **295**, 22-29.
- Levinson G, Gutman GA (1987) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 203-221.
- Li G, Hedgecock D (1998) Genetic heterogeneity, detected by PCR-SSCP, among samples of larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) supports the hypothesis of large variance in reproductive success. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **55**, 1025-1033.
- Li G, Hubert S, Bucklin K, Ribes V, Hedgecock D (2003) Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular Ecology Notes* **3**, 228-232.
- Li H, Liang Y, Sui L, Gao X, He C (2011) Characterization of 10 polymorphic microsatellite markers for Mediterranean blue mussel *Mytilus galloprovincialis* by EST database mining and cross-species amplification. *Journal of Genetics* **90**, E30-E33.
- Li L, Wu X, Yu Z (2013) Genetic diversity and substantial population differentiation in *Crassostrea hongkongensis* revealed by mitochondrial DNA. *Marine Genomics* **11**, 31-37.
- Li R, L Q, Yu R (2009) Parentage determination and effective population size estimation in mass spawning pacific oyster, *Crassostrea gigas*, based on microsatellite analysis. *Journal of the World Aquaculture Society* **40**, 667-677.
- Li R, Li Q, Cornette F, Degremont L, Lapegue S (2010) Development of four EST-SSR multiplex PCRs in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and their validation in parentage assignment. *Aquaculture* **310**, 234-239.

- Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* **11**, 2453-2465.
- Li YC, Korol AB, Fahima T, Nevo E (2004) Microsatellites within genes: Structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution* **21**, 991-1007.
- Lian CL, Zhou ZH, Hogetsu T (2001) A simple method for developing microsatellite markers using amplified fragments of inter-simple sequence repeat (ISSR). *Journal of Plant Research* **114**, 381-385.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**, 1451-1452.
- Lind CE, Evans BS, Knauer J, Taylor JJU, Jerry DR (2009) Decreased genetic diversity and a reduced effective population size in cultured silver-lipped pearl oysters (*Pinctada maxima*). *Aquaculture* **286**, 12-19.
- Lind CE, Evans BS, Taylor JJU, Jerry DR (2007) Population genetics of a marine bivalve, *Pinctada maxima*, throughout the Indo-Australian Archipelago shows differentiation and decreased diversity at range limits. *Molecular Ecology* **16**, 5193-5203.
- Liu HP, Mitton JB, Wu SK (1996) Paternal mitochondrial DNA differentiation far exceeds maternal mitochondrial DNA and allozyme differentiation in the freshwater mussel, *Anodonta grandis grandis*. *Evolution* **50**, 952-957.
- Liu J, Li Q, Kong L, Yu H, Zheng X (2011) Identifying the true oysters (Bivalvia: Ostreidae) with mitochondrial phylogeny and distance-based DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* **11**, 820-830.
- Liu J, Li Q, Kong LF (2009) Isolation and characterization of 13 microsatellite loci in the pen shell *Atrina pectinata* (Bivalvia: Pinnidae). *Conservation Genetics* **10**, 1369-1371.
- Liu YG, Chen SL, Li BF (2005) Assessing the genetic structure of three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) stocks by microsatellite markers. *Aquaculture* **243**, 103-111.
- Liu ZJ, Cordes JF (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* **238**, 1-37.
- Lončar J, Baric R, Bavcevic L, Kozulic B (2014) Parent-offspring relationships following mass spawning of wild Adriatic sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Food*

Technology and Biotechnology **52**, 68-72.

López-Piñón MJ, Insua A, Méndez J (2002) Identification of four scallop species using PCR and restriction analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region. *Marine Biotechnology* **4**, 495-502.

Louzán A, Cerviño-Otero A, Nóvoa s, Ojea J, Martínez D (2008) Seguimiento del ciclo reproductor y desarrollo larvario de una población de coquina *Donax trunculus* (Linné, 1758). En: Rey Méndez M, Fernández Casal J, Lodeiros Seijo C y Guerra Díaz A (eds) *X Foro os Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas e I Foro Iberoamericano dos Recursos Mariños e da Acuicultura*. Asociación Cultural do Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das rías Galegas, O Grove, pp. 475-182.

Lu X, Wang H, Liu B, Xiang J (2011) An effective method for parentage determination of the clam (*Meretrix meretrix*) based on SSR and COI markers. *Aquaculture* **318**, 223-228.

Luis JR, Comesaña AS, Sanjuan A (2011) mtDNA differentiation in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. on the Iberian Peninsula coast: first results. *Marine Ecology-an Evolutionary Perspective* **32**, 102-106.

Lunt DH, Hutchinson WF, Carvalho GR (1999) An efficient method for PCR-based isolation of microsatellite arrays (PIMA). *Molecular Ecology* **8**, 891-893.

Lynch M, O'Hely M (2001) Captive breeding and the genetic fitness of natural populations. *Conservation Genetics* **2**, 363-378.

Macedo MC, Macedo MI, Borges JP (1999) *Conchas marinhas de Portugal*. Editorial Verbo, Lisboa, Portugal.

Machado-Schiaffino G, Dopico E, García-Vázquez E (2007) Genetic variation losses in Atlantic salmon stocks created for supportive breeding. *Aquaculture* **264**, 59-65.

Mackie IM, Pryde SE, Gonzales-Sotelo C, Medina I, Pérez-Martín R, Quinteiro J, Rey-Méndez M, Rehbein H (1999) Challenges in the identification of species of canned fish. *Trends in Food Science & Technology* **10**, 9-14.

Mao Y, Gao T, Yanagimoto T, Xiao Y (2011) Molecular phylogeography of *Ruditapes philippinarum* in the Northwestern Pacific Ocean based on COI gene. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **407**, 171-181.

Marjoram P, Donnelly P (1994) Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences

- in subdivided populations and implications for early human evolution. *Genetics* **136**, 673-683.
- Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M (2002) Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **16**, 47-51.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* **7**, 639-655.
- Martínez A, Mariñas L, González-Tizón A, Méndez J (2002) Cytogenetic characterization of *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) by means of karyotyping, fluorochrome banding and fluorescent in situ hybridization. *Journal of Molluscan Studies* **68**, 393-396.
- Martínez L, Arias A, Méndez J, Insua A, Freire R (2009) Development of twelve polymorphic microsatellite markers in the edible cockle *Cerastoderma edule* (Bivalvia: Cardiidae). *Conservation Genetics Resources* **1**, 107-109.
- Martínez L, Freire R, Arias-Pérez A, Méndez J, Insua A (2015) Patterns of genetic variation across the distribution range of the cockle *Cerastoderma edule* inferred from microsatellites and mitochondrial DNA. *Marine Biology* **162**, 1393-1406.
- Martínez P, Fernández J (2007) Análisis de parentescos mediante el uso de marcadores moleculares. En: Martínez P y Figueras A (eds) *Genética y Genómica en Acuicultura*. Publicaciones científicas y tecnológicas del Observatorio Español de Acuicultura, Madrid, pp. 243-308.
- McInerney CE, Allcock AL, Johnson MP, Bailie DA, Prodoehl PA (2011) Comparative genomic analysis reveals species-dependent complexities that explain difficulties with microsatellite marker development in molluscs. *Heredity* **106**, 78-87.
- McLachlan A, Jaramillo E, Defeo O, Dugan J, de Ruyk A, Coetzee P (1995) Adaptations of bivalves to different beach types. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **187**, 147-160.
- Megléc E (2007) MICROFAMILY (version 1): a computer program for detecting flanking-region similarities among different microsatellite loci. *Molecular Ecology Notes* **7**, 18-20.
- Megléc E, Petenian F, Danchin E, D'Acier AC, Rasplus JY, Faure E (2004) High similarity between flanking regions of different microsatellites detected within

- each of two species of Lepidoptera: *Parnassius apollo* and *Euphydryas aurinia*. *Molecular Ecology* **13**, 1693-1700.
- Miller AD, Versace VL, Matthews T, Bowie KC (2012) The development of 20 microsatellite loci for the Australian marine mollusk, *Donax deltoides*, through next generation DNA sequencing. *Conservation Genetics Resources* **4**, 257-260.
- Mizi A, Zouros E, Moschonas N, Rodakis GC (2005) The complete maternal and paternal mitochondrial genomes of the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: implications for the doubly uniparental inheritance mode of mtDNA. *Molecular Biology and Evolution* **22**, 953-967.
- Molares J, Parada JM, Navarro-Pérez E, Fernández A (2008) Variabilidad interanual de las ventas de los principales recursos marisqueros de Galicia y su relación con las condiciones ambientales. *Revista Galega dos Recursos Mariños (Artículos e Informes técnicos)*. **2**, 1-42.
- Montgomery ME, Ballou JD, Nurthen RK, England PR, Briscoe DA, Frankham R (1997) Minimizing kinship in captive breeding programs. *Zoo Biology* **16**, 377-389.
- Morgante M, Hanafey M, Powell W (1996) Modified amplified fragment length polymorphism assay for detection of polymorphism in microsatellite regions. *International Patent Publication No. WO96/17082*.
- Moritz C, Dowling TE, Brown WM (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for biology and systematic. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**, 269-292.
- Morvezen R, Cornette F, Charrier G, Guinand B, Lapègue S, Boudry P, Laroche J (2013) Multiplex PCR sets of novel microsatellite loci for the great scallop *Pecten maximus* and their application in parentage assignment. *Aquatic Living Resources* **26**, 207-213.
- Munguia-Vega A, Soria G, Pfister T, Cudney-Bueno R (2010) Isolation and characterization of microsatellite loci in the rock scallop (*Spondylus calcifer*) (Bivalvia: Spondylidae) from the Northern Gulf California, Mexico. *Conservation Genetics Resources* **2**, 51-54.
- Mura L, Cossu P, Cannas A, Guinand B, Lapegue S, Boudry P, Laroche J (2012) Genetic variability in the Sardinian population of the manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Biochemical Systematics and Ecology* **41**, 74-82.
- Murakami-Sugihara N, Furota T, Okamoto K (2012) Genetic structure of the exotic hard

clam *Mercenaria mercenaria* in Tokyo Bay, determined using mitochondrial DNA. *Fisheries Science* **78**, 569-575.

- N**aciri M, Lemaire C, Borsa P, Bonhomme F (1999) Genetic study of the Atlantic/Mediterranean transition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Heredity* **90**, 591-596.
- Navarro A, Sánchez-Fontenla J, Cordero D, Faria M, Peña JB, Saavedra C, Blázquez M, Ruíz O, Ureña R, Torreblanca A, Barata C, Piña B (2013) Genetic and phenotypic differentiation of zebra mussel populations colonizing Spanish river basins. *Ecotoxicology* **22**, 915-928.
- Neff BD, Gross MR (2001) Microsatellite evolution in vertebrates: Inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution* **55**, 1717-1733.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**, 583-590.
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R (1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution; International Journal of Organic Evolution* **29**, 1-10.
- Neuberg-Cywiak L, Achituv Y, Mizrahi L (1990) The ecology of *Donax trunculus* Linnaeus and *Donax semistriatus* Poli from the Mediterranean coast of Israel. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **134**, 203-220.
- Nève G, Meglécz E (2000) Microsatellite frequencies in different taxa. *Trends in Ecology & Evolution* **15**, 376-377.
- O**'Connell M, Wright JM (1997) Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **7**, 331-363.
- Oliveira EJ, Padua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* **29**, 294-307.
- Olsen EM, Heino M, Lilly GR, Morgan MJ, Brattey J, Ernande B, Dieckmann U (2004) Maturation trends indicative of rapid evolution preceded the collapse of northern cod. *Nature* **428**, 932-935.
- Ort BS, Pogson GH (2007) Molecular population genetics of the male and female mitochondrial DNA molecules of the california sea mussel, *Mytilus californianus*.

Genetics **177**, 1087-1099.

Ortega-Villaizán M, Suzuki S, Nakajima M, Taniguchi N (2006) Genetic evaluation of interindividual relatedness for broodstock management of the rare species barfin flounder *Verasper moseri* using microsatellite DNA markers. *Fisheries Science* **72**, 33-39.

Ostrander EA, Jong PM, Rine J, Duyk G (1992) Construction of small insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 3419-3423.

Paetkau D (1999) Microsatellites obtained using strand extension: An enrichment protocol. *Biotechniques* **26**, 690-697.

Pampoulie C, Jorundsdottir TD, Steinarsson A, Petursdottir G, Stefansson MO, Danielsdottir AK (2006) Genetic comparison of experimental farmed strains and wild Icelandic populations of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture* **261**, 556-564.

Park S (2001) Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection. Tesis doctoral, Universidad de Dublin.

Passamonti M, Boore JL, Scali V (2003) Molecular evolution and recombination in gender-associated mitochondrial DNAs of the manila clam *Tapes philippinarum*. *Genetics* **164**, 603-611.

Passamonti M, Scali V (2001) Gender-associated mitochondrial DNA heteroplasmy in the venerid clam *Tapes philippinarum* (Mollusca Bivalvia). *Current Genetics* **39**, 117-124.

Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**, 288-295.

Pereira AM, Fernández-Tajes J, Gaspar MB, Méndez J (2012) Identification of the wedge clam *Donax trunculus* by a simple PCR technique. *Food Control* **23**, 268-270.

Pereira F, Carneiro J, Amorim A (2008) Identification of species with DNA-based technology: current progress and challenges. *Recent patents on DNA & gene sequences* **2**, 187-199.

Pereira SM (2013) Estudio genético poblacional en la almeja babosa *Venerupis*

- pullastra*. Tesis doctoral, Universidade da Coruña.
- Pereira SM, Arias A, Méndez J, Insua A, Freire R (2010) Isolation of twelve microsatellite markers in the pullet carpet shell *Venerupis pullastra* (Bivalvia: Veneridae). *Conservation Genetics Resources* **2**, 201-203.
- Pérez-Losada M, Guerra A, Carvalho GR, Sanjuan A, Shaw PW (2002) Extensive population subdivision of the cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca : Cephalopoda) around the Iberian Peninsula indicated by microsatellite DNA variation. *Heredity* **89**, 417-424.
- Perfectti F, Picó FX, Gómez JM (2009) La huella genética de la selección natural. *Ecosistemas* **18**, 10-16.
- Petersen JL, Ibarra AM, Ramirez JL, May B (2008) An induced mass spawn of the hermaphroditic lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus*: Genetic assignment of maternal and paternal parentage. *Journal of Heredity* **99**, 337-348.
- Petrovic V, Pérez-García C, Pasantes JJ, Satović, Prats E, Plohl M (2009) A GC-rich satellite DNA and karyology of the bivalve mollusk *Donax trunculus*: a dominance of GC-rich heterochromatin. *Cytogenetic and Genome Research* **124**, 63-71.
- Petrović V, Plohl M (2005) Sequence divergence and conservation in organizationally distinct subfamilies of *Donax trunculus* satellite DNA. *Gene* **362**, 37-43.
- Pino-Querido A, Álvarez-Castro JM, Vera M, Pardo BG, Fuentes J, Martínez P (2014) A molecular tool for parentage analysis in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Aquaculture Research* **46**, 1721-1735.
- Planes S, Doherty PJ, Bernardi G (2001) Strong genetic divergence among populations of a marine fish with limited dispersal, *Acanthochromis polyacanthus*, within the Great Barrier Reef and the Coral Sea. *Evolution* **55**, 2263-2273.
- Plazzi F, Cassano A, Passamonti M (2015) The quest for Doubly Uniparental Inheritance in heterodont bivalves and its detection in *Meretrix lamarckii* (Veneridae: Meretricinae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **53**, 87-94.
- Plohl M, Cornudella L (1996) Characterization of a complex satellite DNA in the mollusc *Donax trunculus*: Analysis of sequence variations and divergence. *Gene* **169**, 157-164.
- Plohl M, Cornudella L (1997) Characterization of interrelated sequence motifs in four satellite DNAs and their distribution in the genome of the mollusc *Donax*

trunculus. *Journal of Molecular Evolution* **44**, 189-198.

Plohl M, Prats E, Martínez-Lage A, González-Tizón, Méndez J, Cornudella L (2002) Telomeric localization of the vertebrate-type hexamer repeat, (TTAGGG)(n), in the wedgeshell clam *Donax trunculus* and other marine invertebrate genomes. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 19839-19846.

Plough LV, Marko PB (2014) Characterization of microsatellite loci and repeat density in the gooseneck barnacle, *Pollicipes elegans*, using Next Generation Sequencing. *Journal of Heredity* **105**, 136-142.

Porta J, Porta JM, Martínez-Rodríguez G, Álvarez MC (2006a) Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites. *Aquaculture* **251**, 46-55.

Porta J, Porta JM, Martínez-Rodríguez G, Álvarez MD (2006b) Development of a microsatellite multiplex PCR for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and its application to broodstock management. *Aquaculture* **256**, 159-166.

Presa P, Pérez M, Diz AP (2002) Polymorphic microsatellite markers for blue mussels (*Mytilus* spp.). *Conservation Genetics* **3**, 441-443.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.

Qiu Y, Lu H, Zhu J, Chen X, Wang A, Wang Y (2014) Characterization of novel EST-SSR markers and their correlations with growth and nacreous secretion traits in the pearl oyster *Pinctada martensii* (Dunker). *Aquaculture* **420**, S92-S97.

Queller DC, Goodnight KF (1989) Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* **43**, 258-275.

Quesada H, Beynon CM, Skibinski DOF (1995a) A mitochondrial DNA discontinuity in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk: Pleistocene vicariance biogeography and secondary intergradation. *Molecular Biology and Evolution* **12**, 521-524.

Quesada H, Zapata C, Álvarez G (1995b) A multilocus allozyme discontinuity in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: the interaction of ecological and life history factors. *Marine Ecology Progress Series* **116**, 99-115.

Ramón M, Abelló P, Richardson CA (1995) Population structure and growth of *Donax*

- trunculus* (Bivalvia: Donacidae) in the western Mediterranean. *Marine Biology* **121**, 665-671.
- Ramón MM, Castro JA (1997) Genetic variation in natural stocks of *Sardina pilchardus* (sardines) from the western Mediterranean Sea. *Heredity* **78**, 520-528.
- Ramos-Onsins SE, Rozas J (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* **19**, 2092-2100.
- Rand DM, Kann LM (1996) Excess amino acid polymorphism in mitochondrial DNA: Contrasts among genes from *Drosophila*, mice, and humans. *Molecular Biology and Evolution* **13**, 735-748.
- Rasmussen RS, Morrissey MT (2008) DNA-Based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **7**, 280-295.
- Rawson PD, Hilbish TJ (1995) Evolutionary relationships among the male and female mitochondrial DNA lineages in the *Mytilus edulis* species complex. *Molecular Biology and Evolution* **12**, 893-901.
- Ray N, Currat M, Excoffier L (2003) Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Molecular Biology and Evolution* **20**, 76-86.
- R Core Team (2014) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Reece KS, Ribeiro WL, Gaffney PM, Carnegie RB, Allen SK (2004) Microsatellite marker development and analysis in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*): Confirmation of null alleles and non-Mendelian segregation ratios. *Journal of Heredity* **95**, 346-352.
- Rehbein H (1990) Electrophoretic techniques for species identification of fishery products. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung* **191**, 1-10.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**, 223-225.
- Ríos C, Sanz S, Saavedra C, Pena JB (2002) Allozyme variation in populations of scallops, *Pecten jacobaeus* (L.) and *P. maximus* (L.) (Bivalvia: Pectinidae), across the Almeria-Oran front. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **267**, 223-244.
- Rogers AR, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* **9**, 552-569.

- Rohling E, Abu-Zied R, Casford J, Hayes A, Hoogakker B (2009) The marine environment: present and past. En: Woodward J (ed) *The physical geography of the Mediterranean*. Oxford University Press, pp. 33-67.
- Ross CL, Dyer KA, Erez T, Miller SJ, Jaenike J, Markow TA (2003) Rapid divergence of microsatellite abundance among species of *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution* **20**, 1143-1157.
- Ross PM, Hogg ID, Pilditch CA, Lundquist CJ, Wilkins RJ (2012) Population genetic structure of the New Zealand estuarine clam *Austrovenus stutchburyi* (Bivalvia: Veneridae) reveals population subdivision and partial congruence with biogeographic boundaries. *Estuaries and Coasts* **35**, 143-154.
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* **145**, 1219-1228.
- Rousset F (2008) GENEPOP '007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* **8**, 103-106.
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: Krawetz S y Misener S (eds) *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 365-386.
- Rufino MM, Gaspar MB, Pereira AM, Maynou F, Monteiro CC (2010) Ecology of megabenthic bivalve communities from sandy beaches on the south coast of Portugal. *Scientia Marina* **74**, 163-178.
- Ryman N, Laikre L (1991) Effects of supportive breeding on the genetically effective population size. *Conservation Biology* **5**, 325-329.
- Ryman N, Utter F, Laikre L (1995) Protection of intraspecific biodiversity of exploited fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **5**, 417-446.
- S**aavedra C, Zapata C, Guerra A, Alvarez G (1993) Allozyme variation in European populations of the oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology* **115**, 85-95.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425.
- Salas C, Tirado C, Manjón-Cabeza ME (2001) Sublethal foot-predation on *Donacidae* (Mollusca : Bivalvia). *Journal of Sea Research* **46**, 43-56.

- Salat J (1996) Review of hydrographic environmental factors that may influence anchovy habitats in northwestern Mediterranean. *Scientia Marina* **60**, 21-32.
- Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular cloning. A laboratory manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanjuan A, Comesaña AS, De Carlos A (1996) Macrogeographic differentiation by mtDNA restriction site analysis in the SW European *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **198**, 89-100.
- Sanjuan A, Zapata C, Álvarez G (1994) *Mytilus galloprovincialis* and *M. edulis* on the coasts of the Iberian Peninsula. *Marine Ecology Progress Series* **113**, 131-146.
- Sanjuan A, Zapata C, Álvarez G (1997) Genetic differentiation in *Mytilus galloprovincialis* LMK. throughout the world. *Ophelia* **47**, 13-31.
- Santaclara FJ, Espiñeira M, Cabado AG, Aldasoro, A, Gonzalez-Lavín N, Vieites JM (2006) Development of a method for the genetic identification of mussel species belonging to *Mytilus*, *Perna*, *Aulacomya*, and other genera. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 8461-8470.
- Santana QC, Coetzee MPA, Steenkamp ET, Mlonyeni O, Hammond G, Wingfield M, Wingfield B (2009) Microsatellite discovery by deep sequencing of enriched genomic libraries. *Biotechniques* **46**, 217-223.
- Satovic E, Plohl M (2013) Tandem repeat-containing MITEs in the clam *Donax trunculus*. *Genome Biology and Evolution* **5**, 2549-2559.
- Saura M, Faria R (2011) Genetic tools for restoration of fish populations. *Journal of Applied Ichthyology* **27**, 5-15.
- Schlötterer C (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* **109**, 365-371.
- Schlötterer C (1998) Microsatellites. En: Hoelzel A (ed) *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach*. Oxford University Press, New York, pp. 237-261.
- Schlötterer C, Tautz D (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* **20**, 211-215.
- Schlötterer C (2004) The evolution of molecular markers – just a matter a fashion? *Nature Reviews Genetics* **5**, 63-69
- Scribner KT, Gust JR, Fields RL (1996) Isolation and characterization of novel salmon

- microsatellite loci: Cross-species amplification and population genetic applications. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **53**, 833-841.
- Sekino M, Hamaguchi M, Aranishi F, Okoshi K (2003a) Development of novel microsatellite DNA markers from the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biotechnology* **5**, 227-233.
- Sekino M, Saitoh K, Yamada T, Kumagai A, Hara M, Yamashita Y (2003b) Microsatellite-based pedigree tracing in a Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery strain: implications for hatchery management related to stock enhancement program. *Aquaculture* **221**, 255-263.
- Sell J, Mioduchowska M, Kaczmarczyk A, Szymanczak R (2013) Identification and characterization of the first microsatellite loci for the thick-shelled river mussel *Unio crassus* (Bivalvia: Unionidae). *Journal of experimental zoology. Part A, Ecological genetics and physiology* **319**, 113-116.
- Shaw PW, Pierce GJ, Boyle PR (1999) Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology* **8**, 407-417.
- Skibinski DOF, Gallagher C, Beynon CM (1994a) Mitochondrial DNA inheritance. *Nature* **368**, 817-818.
- Skibinski DOF, Gallagher C, Beynon CM (1994b) Sex-Limited mitochondrial DNA transmission in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Genetics* **138**, 801-809.
- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* **236**, 787-792.
- Slatkin M (1994) An exact test for neutrality based on the Ewens sampling distribution. *Genetical Research* **64**, 71-74.
- Slatkin M (1996) A correction to the exact test based on the Ewens sampling distribution. *Genetical Research* **68**, 259-260.
- Small MP, Gosling EM (2000a) Genetic structure and relationships in the snail species complex *Littorina arcana* Hannaford Ellis, *L. compressa* Jeffreys and *L. saxatilis* (Olivi) in the British Isles using SSCPs of cytochrome-b fragments. *Heredity* **84**, 692-701.
- Small MP, Gosling EM (2000b) Species relationships and population structure of *Littorina saxatilis* Olivi and *L. tenebrosa* Montagu in Ireland using single-strand conformational polymorphisms (SSCPs) of cytochrome b fragments. *Molecular*

Ecology **9**, 39-52.

Śmietanka B, Burzynski A, Wenne R (2009) Molecular population genetics of male and female mitochondrial genomes in European mussels *Mytilus*. *Marine Biology* **156**, 913-925.

Śmietanka B, Zbawicka M, Sanko T, Wenne R, Burzynski A (2013) Molecular population genetics of male and female mitochondrial genomes in subarctic *Mytilus trossulus*. *Marine Biology* **160**, 1709-1721.

Śmietanka B, Zbawicka M, Wolowicz M, Wenne R (2004) Mitochondrial DNA lineages in the European populations of mussels (*Mytilus* spp.). *Marine Biology* **146**, 79-92.

Sotelo CG, Pineiro C, Gallardo JM, Perezmartin RI (1993) Fish species identification in seafood products. *Trends in Food Science & Technology* **4**, 395-401.

Stewart DT, Kenchington ER, Singh RK, Zouros E (1996) Degree of selective constraint as an explanation of the different rates of evolution of gender-specific mitochondrial DNA lineages in the mussel *Mytilus*. *Genetics* **143**, 1349-1357.

Stewart DT, Saavedra C, Stanwood RR, Ball AO, Zouros E (1995) Male and female mitochondrial DNA lineages in the blue mussel (*Mytilus edulis*) species group. *Molecular Biology and Evolution* **12**, 735-747.

Sutherland B, Stewart D, Kenchington ER, Zouros E (1998) The fate of paternal mitochondrial DNA in developing female mussels, *Mytilus edulis*: Implications for the mechanism of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genetics* **148**, 341-347.

Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**, 585-595.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**, 2731-2739.

Taris N, Baron S, Sharbel TF, Sauvage C, Boudry P (2005) A combined microsatellite multiplexing and boiling DNA extraction method for high-throughput parentage analyses in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture Research* **36**, 516-518.

- Taris N, Ernande B, McCombie H, Boudry P (2006) Phenotypic and genetic consequences of size selection at the larval stage in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **333**, 147-158.
- Tarnowska K, Chenuil A, Nikula R, Feral JP, Wolowicz M (2010) Complex genetic population structure of the bivalve *Cerastoderma glaucum* in a highly fragmented lagoon habitat. *Marine Ecology Progress Series* **406**, 173-184.
- Tave D (1999) Inbreeding and brood stock management. Fisheries Technical Paper No. 392, 122p.
- Tebble N (1966) *British bivalve seashells. A handbook for identification.*, British Museum, Edinburgh.
- Teletchea F, Maudet C, Hanni C (2005) Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends in Biotechnology* **23**, 359-366.
- Teske PR, Papadopoulos I, Barker NP, McQuaid CDC (2012) Mitochondrial DNA paradox: sex-specific genetic structure in a marine mussel - despite maternal inheritance and passive dispersal. *Bmc Genetics* **13**.
- Tessier N, Bernatchez L, Wright JM (1997) Population structure and impact of supportive breeding inferred from mitochondrial and microsatellite DNA analyses in land-locked Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Molecular Ecology* **6**, 735-750.
- Thébaud O, Véron G, Fifas S (2005) Incidences des e'pisodes d'efflorescences de micro algues toxiques sur les écosystèmes et sur les pêcheries de coquillages en baie de Douarnenez. En: *Rapport Ifremer R.INT.DCB/CEM - DCB/STH/UDPP 05-010.*, Brest, France.
- Theologidis I, Fodelianakis S, Gaspar MB, Zouros E (2008) Doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial dna in *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) and the problem of its sporadic detection in Bivalvia. *Evolution* **62**, 959-970.
- Therriault TW, Docker MF, Orlova MI, Heath DD, MacIsaac HJ (2004) Molecular resolution of the family *Dreissenidae* (Mollusca : Bivalvia) with emphasis on Ponto-Caspian species, including first report of *Mytilopsis leucophaeata* in the Black Sea basin. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **30**, 479-489.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*

22, 4673-4680.

Tintore J, Laviolette PE, Blade I, Cruzado A (1988) A study of an intense density front in the eastern Alboran Sea: The Almeria-Oran front. *Journal of Physical Oceanography* **18**, 1384-1397.

Tirado C, Salas C (1998) Reproduction and fecundity of *Donax trunculus* L., 1758 (Bivalvia: Donacidae) in the littoral of Málaga (Southern Spain). *Journal of Shellfish Research* **17**, 169-176.

Tóth G, Gaspari Z, Jurka J (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research* **10**, 967-981.

Unseld M, Beyermann B, Brandt P, Hiesel R (1995) Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. *PCR-Methods and Applications* **4**, 241-243.

Vadopalas B, Leclair LL, Bentzen P (2004) Microsatellite and allozyme analyses reveal few genetic differences among spatially distinct aggregations of geoduck clams (*Panopea abrupta*, Conrad 1849). *Journal of Shellfish Research* **23**, 693-706.

Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**, 535-538.

Vandeputte M, Rossignol M-N, Pincet C (2011) From theory to practice: Empirical evaluation of the assignment power of marker sets for pedigree analysis in fish breeding. *Aquaculture* **314**, 80-86.

Vargas J, Pérez M, Toro J, Astorga MP (2015) Presence of two mitochondrial genomes in the mytilid *Perumytilus purpuratus*: Phylogenetic evidence for doubly uniparental inheritance. *Genetics and Molecular Biology* **38**, 173-181.

Vasemägi A, Primmer CR (2005) Challenges for identifying functionally important genetic variation: the promise of combining complementary research strategies. *Molecular Ecology* **14**, 3623-3642.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al.* (1995) AFLP - A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**, 4407-4414.

- W**achirachaikarn A, Prakoon W, Nguyen TTT, Prompakdee W, Na-Nakorn U (2011) Loss of genetic variation of *Phalacrodon bleekeri* (Gunther, 1864) in the hatchery stocks revealed by newly developed microsatellites. *Aquaculture* **321**, 298-302.
- Walsh MR, Munch SB, Chiba S, Conover DO (2006) Maladaptive changes in multiple traits caused by fishing: impediments to population recovery. *Ecology Letters* **9**, 142-148.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* **10**, 506-513.
- Wang H, Huan P, Lu X, Liu B (2011) Mining of EST-SSR markers in clam *Meretrix meretrix* larvae from 454 shotgun transcriptome. *Genes & Genetic Systems* **86**, 197-205.
- Wang J (2010a) Effects of genotyping errors on parentage exclusion analysis. *Molecular Ecology* **19**, 5061-5078.
- Wang IJ (2010b) Recognizing the temporal distinctions between landscape genetics and phylogeography. *Molecular Ecology* **19**, 2605-2608.
- Wang Y, Wang X, Wang A, Guo X (2010) A 16-microsatellite multiplex assay for parentage assignment in the eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin). *Aquaculture* **308**, S28-S33.
- Ward RD (2000) Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia* **420**, 191-201.
- Ward RD (2006) The importance of identifying spatial population structure in restocking and stock enhancement programmes. *Fisheries Research* **80**, 9-18.
- Warrior R, Gall J (1985) The mitochondrial DNA of *Hydra attenuata* and *Hydra littoralis* consists of two linear molecules. *Archives des Sciences, Geneva*. **38**, 439-445.
- Watterson GA (1978) Homozygosity test of neutrality. *Genetics* **88**, 405-417.
- Watterson GA (1986) The homozygosity test after a change in population size. *Genetics* **112**, 899-907.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- Westfall KM, Wimberger PH, Gardner JPA (2010) An RFLP assay to determine if *Mytilus galloprovincialis* Lmk. (Mytilidae: Bivalvia) is of Northern or Southern

- hemisphere origin. *Molecular Ecology Resources* **10**, 573-575.
- Whitlock MC, McCauley DE (1999) Indirect measures of gene flow and migration: F_{ST} not equal $1/(4Nm+1)$. *Heredity* **82**, 117-125.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**, 6531-6535.
- Wolstenholme DR (1992) Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *International Review of Cytology: a Survey of Cell Biology* **141**, 173-216.
- Wynen LP, Goldsworthy SD, Guinet C, Bester MN, Boyd IL, Gjertz I, Hofmeyr GJ, White RW, Slade R (2000) Postsealing genetic variation and population structure of two species of fur seal (*Arctocephalus gazella* and *A. tropicalis*). *Molecular Ecology* **9**, 299-314.
- X**iao J, Cordes JF, Jones KC, Reece KS (2008) Eleven novel microsatellite markers for the Asian oyster *Crassostrea ariakensis*. *Molecular Ecology Resources* **8**, 843-845.
- Xu ZK, Primavera JH, de la Pena LD, Pettit P, Belak J, Alcivar-Warren A (2001) Genetic diversity of wild and cultured Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture* **199**, 13-40.
- Xue DX, Wang HY, Zhang T, Liu JX (2014) Population genetic structure and demographic history of *Atrina pectinata* based on mitochondrial DNA and microsatellite markers. *Plos One* **9**.
- Y**asuda N, Nagai S, Yamaguchi S, Lian CL, Hamaguchi M (2007) Development of microsatellite markers for the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Molecular Ecology Notes* **7**, 43-45.
- Yu DH, Chu KH (2006) Genetic variation in wild and cultured populations of the pearl oyster *Pinctada fucata* from southern China. *Aquaculture* **258**, 220-227.
- Yu JN, Kim BJ, Yun YE, Kim HS, Bae CH, Kim S, Oh K, Lim CE (2014) Characterization of 11 novel polymorphic microsatellite loci in the threatened Korean loach, *Iksookimia koreensis*, isolated using a next-generation sequencing method. *Biochemical Systematics and Ecology* **56**, 132-137.

Yu ZN, Kong XY, Zhang LS, Guo XM, Xiang JH (2003) Taxonomic status of four *Crassostrea* oysters from China as inferred from mitochondrial DNA sequences. *Journal of Shellfish Research* **22**, 31-38.

Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* **11**, 1-16.

Zane L, Ostellari L, Maccatrozzo L, *et al.* (2000) Genetic differentiation in a pelagic crustacean (*Meganyctiphanes norvegica*: Euphausiacea) from the North East Atlantic and the Mediterranean Sea. *Marine Biology* **136**, 191-199.

Zeichen MM, Agnesi S, Mariani A, Maccaroni A, Ardizzone GD (2002) Biology and population dynamics of *Donax trunculus* L. (Bivalvia : Donacidae) in the South Adriatic Coast (Italy). *Estuarine Coastal and Shelf Science* **54**, 971-982.

Zouros E (2013) Biparental Inheritance Through Uniparental Transmission: The Doubly Uniparental Inheritance (DUI) of Mitochondrial DNA. *Evolutionary Biology* **40**, 1-31.

Zouros E, Ball AO, Saavedra C, Freeman KR (1994a) An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 7463-7467.

Zouros E, Ball AO, Saavedra C, Freeman KR (1994b) Mitochondrial DNA inheritance. *Nature* **368**, 818-818.

Zouros E, Foltz DW (1984) Possible Explanations of Heterozygote Deficiency in Bivalve Mollusks. *Malacologia* **25**, 583-591.



ANEXO A. Características de los *loci* microsatélite incluidos en la *Multiplex 1* y analizados en 17 localidades de la Península Ibérica

		Dtr53	Dtr70	Dtr86	Dtr126	Dtr174	Dtr199	Dtr323
AL	<i>N</i>	49	50	45	39	44	49	50
	<i>Na</i>	25	7	11(1)	10	7	8	5
	<i>R</i>	193-421	92-116	67-124	172-242	79-135	170-197	129-177
	<i>A_c</i>	213/413	104	96	195	122	189	165
	<i>Frec A_c</i>	0,225	0,390	0,289	0,346	0,580	0,796	0,870
	<i>Rs</i>	14,233	5,560	8,636	8,131	5,612	4,640	3,664
	<i>He</i>	0,888	0,734	0,835	0,782	0,617	0,357	0,240
	<i>Ho</i>	0,796*	0,740	0,756	0,308**	0,432*	0,347	0,240
	<i>Fis</i>	0,105	-0,008	0,096	0,609	0,302	0,029	0,002
VC	<i>N</i>	47	50	29	38	44	50	50
	<i>Na</i>	20	5	7	9	10	5	4
	<i>R</i>	195-421	92-108	80-116	172-242	78-188	181-197	129-177
	<i>A_c</i>	413	104	96	195	122	189	165
	<i>Frec A_c</i>	0,234	0,390	0,345	0,355	0,466	0,870	0,910
	<i>Rs</i>	12,784	4,514	6,005	6,931	6,571	3,489	3,022
	<i>He</i>	0,890	0,721	0,762	0,763	0,674	0,239	0,171
	<i>Ho</i>	0,766	0,680	0,690	0,263**	0,341**	0,200*	0,140
	<i>Fis</i>	0,141	0,058	0,096	0,658	0,497	0,165	0,181
LN	<i>N</i>	43	50	35	33	47	50	49
	<i>Na</i>	18	6	12	7	9	5	5(1)
	<i>R</i>	193-417	92-112	72-112	176-242	79-135	178-193	129-177
	<i>A_c</i>	413	96	96	188	122	189	165
	<i>Frec A_c</i>	0,349	0,330	0,286	0,364	0,553	0,690	0,857
	<i>Rs</i>	11,722	5,242	8,858	6,145	6,571	4,209	3,538
	<i>He</i>	0,830	0,734	0,816	0,751	0,545	0,496	0,260
	<i>Ho</i>	0,674*	0,720	0,629	0,636*	0,340**	0,500	0,204
	<i>Fis</i>	0,190	0,019	0,232	0,154	0,483	-0,009	0,216
BQ	<i>N</i>	49	50	34	42	42	45	50
	<i>Na</i>	18	6	9	9	6	6(1)	5(1)
	<i>R</i>	193-417	92-112	72-108	166-207	79-135	166-201	129-177
	<i>A_c</i>	213	104	88	188	122	189	165
	<i>Frec A_c</i>	0,235	0,380	0,294	0,441	0,571	0,778	0,790
	<i>Rs</i>	12,701	5,165	7,619	6,717	5,366	3,899	3,649
	<i>He</i>	0,883	0,744	0,825	0,719	0,622	0,376	0,358
	<i>Ho</i>	0,755	0,620*	0,618**	0,167**	0,286**	0,378	0,340
	<i>Fis</i>	0,146	0,168	0,254	0,770	0,543	-0,005	0,050

ANEXO A. (continuación)

		Dtr53	Dtr70	Dtr86	Dtr126	Dtr174	Dtr199	Dtr323
CR	<i>N</i>	47	48	34	43	46	50	50
	<i>Na</i>	21	6	11	12	9	5	5
	<i>R</i>	191-415	92-112	72-116	172-207	78-135	181-201	129-177
	<i>A_c</i>	213	104	84/96	188	122	189	165
	<i>Frec A_c</i>	0,287	0,396	0,235	0,314	0,554	0,830	0,870
	<i>Rs</i>	12,322	5,185	8,292	8,364	6,604	3,846	3,733
	<i>He</i>	0,866	0,723	0,835	0,795	0,643	0,304	0,241
	<i>Ho</i>	0,745*	0,542*	0,765	0,372**	0,326**	0,340	0,220
	<i>Fis</i>	0,141	0,253	0,086	0,535	0,496	-0,121	0,086
VI	<i>N</i>	39	45	34	38	41	44	45
	<i>Na</i>	18	6	10(1)	5	9	5	4
	<i>R</i>	198-419	92-116	72-108	184-195	79-188	170-193	129-177
	<i>A_c</i>	213	104	96	188	122	189	165
	<i>Frec A_c</i>	0,321	0,333	0,265	0,540	0,610	0,818	0,878
	<i>Rs</i>	11,938	5,078	8,054	4,088	6,759	3,842	2,696
	<i>He</i>	0,842	0,749	0,835	0,622	0,601	0,322	0,222
	<i>Ho</i>	0,821	0,644*	0,618*	0,316**	0,244**	0,318	0,156
	<i>Fis</i>	0,025	0,141	0,264	0,496	0,597	0,012	0,301
BS	<i>N</i>	47	48	36	47	48	50	50
	<i>Na</i>	19	6	12(1)	9	6	7	3
	<i>R</i>	193-417	92-112	72-112	176-242-	79-135	176-201	129-165
	<i>A_c</i>	213	96	96	188	122	189	165
	<i>Frec A_c</i>	0,192	0,354	0,292	0,372	0,625	0,830	0,850
	<i>Rs</i>	12,079	5,061	9,268	6,641	4,619	4,301	2,683
	<i>He</i>	0,897	0,735	0,838	0,740	0,552	0,306	0,265
	<i>Ho</i>	0,723*	0,729	0,750*	0,383**	0,292**	0,320	0,220
	<i>Fis</i>	0,195	0,008	0,106	0,485	0,474	-0,046	0,171
CL	<i>N</i>	49	50	32	42	47	48	50
	<i>Na</i>	22	6	8(1)	10	9	5	5
	<i>R</i>	195-417	92-112	72-106	166-242	78-135	178-193	129-177
	<i>A_c</i>	213	104	96	188	122	189	165
	<i>Frec A_c</i>	0,250	0,290	0,313	0,298	0,511	0,781	0,800
	<i>Rs</i>	13,811	5,391	7,077	7,681	6,754	3,952	3,765
	<i>He</i>	0,880	0,768	0,809	0,815	0,680	0,375	0,345
	<i>Ho</i>	0,717*	0,760	0,719	0,381**	0,319**	0,396	0,240*
	<i>Fis</i>	0,186	0,010	0,113	0,535	0,533	-0,055	0,306

ANEXO A. (continuación)

		Dtr53	Dtr70	Dtr86	Dtr126	Dtr174	Dtr199	Dtr323
LZ	<i>N</i>	48	49	38	44	39	50	50
	<i>Na</i>	23	5	11	9	9	5	5
	<i>R</i>	193-417	92-108	67-108	172-242	79-188	181-193	129-177
	<i>A_c</i>	213	104	96	188	122	189	165
	<i>Frec A_c</i>	0,219	0,469	0,368	0,364	0,551	0,810	0,870
	<i>Rs</i>	13,787	4,737	7,917	6,531	6,797	4,003	3,410
	<i>He</i>	0,893	0,690	0,783	0,763	0,654	0,336	0,239
	<i>Ho</i>	0,813	0,633	0,711	0,273**	0,436*	0,360	0,180
	<i>Fis</i>	0,091	0,083	0,093	0,645	0,336	0,073	0,249
SE	<i>N</i>	30	38	33	28	42	49	48
	<i>Na</i>	17	6	9	11(1)	8	5(1)	5(1)
	<i>R</i>	191-413	92-112	80-112	174-252	79-135	160-193	129-179
	<i>A_c</i>	413	96	96	195	122	189	165
	<i>Frec A_c</i>	0,133	0,329	0,303	0,321	0,667	0,816	0,833
	<i>Rs</i>	13,768	4,983	6,802	8,488	6,167	3,765	3,219
	<i>He</i>	0,916	0,730	0,788	0,805	0,540	0,324	0,292
	<i>Ho</i>	0,867	0,790	0,818	0,393**	0,381*	0,367	0,333
	<i>Fis</i>	0,055	-0,082	-0,039	0,516	0,297	-0,135	-0,142
MG	<i>N</i>	50	50	39	43	45	50	50
	<i>Na</i>	24	6	9	9	9	6	4
	<i>R</i>	193-419	92-112	67-101	176-242	78-135	178-201	129-177
	<i>A_c</i>	413	104	96	195	122	189	165
	<i>Frec A_c</i>	0,250	0,430	0,295	0,395	0,667	0,780	0,800
	<i>Rs</i>	14,853	5,020	7,491	6,331	5,677	4,108	3,468
	<i>He</i>	0,901	0,711	0,820	0,754	0,525	0,378	0,346
	<i>Ho</i>	0,820	0,700	0,769	0,349**	0,333*	0,360	0,220*
	<i>Fis</i>	0,091	0,016	0,062	0,540	0,368	0,048	0,367
MÑ	<i>N</i>	48	50	38	41	48	50	50
	<i>Na</i>	19	7	11	9	6	5	5
	<i>R</i>	198-417	92-112	67-108	176-242	79-135	178-193	129-177
	<i>A_c</i>	413	104	96	188	122	189	165
	<i>Frec A_c</i>	0,156	0,330	0,224	0,329	0,677	0,840	0,880
	<i>Rs</i>	13,722	5,882	8,261	6,905	5,308	3,416	3,458
	<i>He</i>	0,909	0,761	0,847	0,785	0,519	0,286	0,223
	<i>Ho</i>	0,813	0,720*	0,711*	0,463**	0,292**	0,320	0,240
	<i>Fis</i>	0,107	0,054	0,163	0,413	0,441	-0,122	-0,078

ANEXO A. (continuación)

		Dtr53	Dtr70	Dtr86	Dtr126	Dtr174	Dtr199	Dtr323
CA	<i>N</i>	29	36	20	32	44	45	46
	<i>Na</i>	17	7	6	7	6	6	3
	<i>R</i>	191-413	92-112	80-101	184-242	79-135	178-201	129-165
	<i>A_c</i>	213	104	84	188	122	189	165
	<i>Frec A_c</i>	0,207	0,319	0,325	0,328	0,739	0,867	0,783
	<i>Rs</i>	13,980	5,996	5,764	5,824	4,445	3,821	2,928
	<i>He</i>	0,920	0,756	0,786	0,752	0,437	0,246	0,364
	<i>Ho</i>	0,655*	0,861	0,650*	0,500*	0,296*	0,200*	0,435
	<i>Fis</i>	0,291	-0,141	0,177	0,339	0,326	0,189	-0,197
FU	<i>N</i>	48	50	37	39	43	44	50
	<i>Na</i>	18	7	10	11	8	8(2)	5
	<i>R</i>	193-417	92-116	76-108	172-275	79-188	181-238	129-177
	<i>A_c</i>	202	100	96	188	122	181	165
	<i>Frec A_c</i>	0,406	0,320	0,338	0,321	0,384	0,477	0,860
	<i>Rs</i>	11,211	5,813	7,440	7,570	6,907	6,217	3,374
	<i>He</i>	0,801	0,755	0,795	0,782	0,789	0,703	0,254
	<i>Ho</i>	0,688	0,640	0,784	0,564*	0,233**	0,432**	0,220
	<i>Fis</i>	0,143	0,154	0,014	0,281	0,708	0,389	0,135
GA	<i>N</i>	47	50	42	40	26	47	49
	<i>Na</i>	24(2)	6	11	11	8	5	4(1)
	<i>R</i>	191-419	92-112	80-116	176-242	78-135	181-201	129-169
	<i>A_c</i>	413	100	96	193	122	189	165
	<i>Frec A_c</i>	0,245	0,340	0,262	0,250	0,250	0,723	0,918
	<i>Rs</i>	15,642	5,840	8,008	8,819	7,070	4,145	2,826
	<i>He</i>	0,913	0,780	0,822	0,853	0,826	0,452	0,156
	<i>Ho</i>	0,681**	0,640	0,476**	0,450**	0,115**	0,404	0,061*
	<i>Fis</i>	0,256	0,181	0,424	0,475	0,863	0,107	0,609
DE	<i>N</i>	43	49	38	44	16	50	50
	<i>Na</i>	24(1)	6	12	12	7	7(2)	4
	<i>R</i>	191-419	92-112	67-108	174-242	78-135	152-226	129-177
	<i>A_c</i>	413	104	84	195	122	189	165
	<i>Frec A_c</i>	0,174	0,286	0,290	0,273	0,281	0,810	0,900
	<i>Rs</i>	14,862	5,781	8,754	8,448	7,000	4,634	3,091
	<i>He</i>	0,925	0,799	0,820	0,831	0,833	0,337	0,188
	<i>Ho</i>	0,814	0,633*	0,526**	0,409**	0,188**	0,280*	0,160
	<i>Fis</i>	0,121	0,210	0,362	0,511	0,780	0,170	0,151

ANEXO A. (continuación)

		Dtr53	Dtr70	Dtr86	Dtr126	Dtr174	Dtr199	Dtr323
MA	<i>N</i>	45	50	36	43	22	49	49
	<i>Na</i>	25(2)	6	11	13	8	6	3
	<i>R</i>	191-427	92-112	67-108	172-275	78-135	176-201	129-165
	<i>A_c</i>	413	104	88	188/195	122	189	165
	<i>Frec A_c</i>	0,233	0,350	0,264	0,267	0,227	0,878	0,898
	<i>Rs</i>	15,503	4,820	9,266	9,159	7,919	3,769	2,643
	<i>He</i>	0,909	0,732	0,853	0,819	0,871	0,228	0,190
	<i>Ho</i>	0,733*	0,660	0,694*	0,372**	0,000**	0,225	0,163
	<i>Fis</i>	0,195	0,099	0,188	0,548	1,000	0,016	0,140

N: número de individuos; *Na*: número de alelos (alelos privados); *R*: rango de tamaño de los alelos en pares de bases; *A_c*: tamaño en pares de bases del alelo más común; *Frec A_c*: frecuencia del alelo más común; *Rs*: riqueza alélica basada en un tamaño muestral mínimo de 16 individuos; *He*: heterocigosidad esperada insesgada de Nei; *Ho*: heterocigosidad observada; *Fis*: coeficiente de endogamia; (*): significativo para un $\alpha=0,05$; (**): significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni

ANEXO B. Características de los *loci* microsatélite incluidos en la *Multiplex 2* y analizados en 17 localidades de la Península Ibérica

		Dtr43	Dtr47	Dtr108	Dtr117
AL	<i>N</i>	44	48	47	41
	<i>Na</i>	11	5(1)	6	13
	<i>R</i>	109-126	124-134	107-123	134-161
	<i>A_c</i>	116	126	115	134/158
	<i>Frec A_c</i>	0,318	0,479	0,777	0,281
	<i>Rs</i>	8,449	3,951	4,388	9,181
	<i>He</i>	0,812	0,591	0,385	0,820
	<i>Ho</i>	0,634*	0,583	0,234*	0,585**
	<i>Fis</i>	0,219	0,012	0,394	0,289
VC	<i>N</i>	45	48	44	44
	<i>Na</i>	9	5	5	10
	<i>R</i>	109-124	122-130	115-127	134-161
	<i>A_c</i>	116	126	115	158
	<i>Frec A_c</i>	0,344	0,490	0,841	0,273
	<i>Rs</i>	5,978	3,925	3,461	8,648
	<i>He</i>	0,721	0,581	0,284	0,848
	<i>Ho</i>	0,444**	0,563	0,136*	0,296**
	<i>Fis</i>	0,386	0,033	0,523	0,654
LN	<i>N</i>	39	49	46	47
	<i>Na</i>	9	6	4	11
	<i>R</i>	105-126	122-132	115-123	128-161
	<i>A_c</i>	116	126	115	158
	<i>Frec A_c</i>	0,321	0,469	0,880	0,255
	<i>Rs</i>	7,133	4,002	3,031	7,978
	<i>He</i>	0,785	0,582	0,220	0,829
	<i>Ho</i>	0,615	0,633	0,065**	0,553**
	<i>Fis</i>	0,219	-0,089	0,706	0,335
BQ	<i>N</i>	46	50	50	48
	<i>Na</i>	10	6	5	12
	<i>R</i>	105-126	122-132	107-123	125-161
	<i>A_c</i>	118	124	115	134
	<i>Frec A_c</i>	0,359	0,460	0,830	0,260
	<i>Rs</i>	7,477	4,192	3,683	8,392
	<i>He</i>	0,778	0,589	0,302	0,828
	<i>Ho</i>	0,478**	0,560	0,220	0,417**
	<i>Fis</i>	0,388	0,050	0,274	0,499

ANEXO B. (continuación)

		Dtr43	Dtr47	Dtr108	Dtr117
CR	<i>N</i>	42	49	49	47
	<i>Na</i>	9	4	6	15(1)
	<i>R</i>	109-124	124-130	113-149	125-161
	<i>A_c</i>	116	126	115	158
	<i>Frec A_c</i>	0,393	0,490	0,867	0,277
	<i>Rs</i>	6,629	3,398	3,920	10,085
	<i>He</i>	0,745	0,562	0,246	0,841
	<i>Ho</i>	0,476*	0,551	0,143*	0,426**
	<i>Fis</i>	0,363	0,020	0,421	0,496
VI	<i>N</i>	48	50	49	49
	<i>Na</i>	10	6	7	13
	<i>R</i>	109-126	122-132	107-149	131-161
	<i>A_c</i>	116/118	124	115	134
	<i>Frec A_c</i>	0,313	0,460	0,714	0,286
	<i>Rs</i>	7,461	4,238	4,479	9,058
	<i>He</i>	0,784	0,605	0,458	0,833
	<i>Ho</i>	0,688	0,600	0,122**	0,653*
	<i>Fis</i>	0,124	0,008	0,735	0,218
BS	<i>N</i>	45	48	45	48
	<i>Na</i>	9	6	3	12(1)
	<i>R</i>	105-124	122-132	115-123	123-161
	<i>A_c</i>	116	124	115	134
	<i>Frec A_c</i>	0,389	0,542	0,889	0,250
	<i>Rs</i>	7,093	4,100	2,791	9,388
	<i>He</i>	0,755	0,576	0,206	0,850
	<i>Ho</i>	0,622*	0,563	0,133*	0,479**
	<i>Fis</i>	0,178	0,024	0,355	0,439
CL	<i>N</i>	47	49	45	44
	<i>Na</i>	10	5	7	14
	<i>R</i>	10-126	124-132	107-127	125-161
	<i>A_c</i>	116	126	115	158
	<i>Frec A_c</i>	0,319	0,418	0,789	0,318
	<i>Rs</i>	7,448	4,247	4,906	9,234
	<i>He</i>	0,785	0,651	0,371	0,822
	<i>Ho</i>	0,596*	0,449*	0,133**	0,523**
	<i>Fis</i>	0,243	0,313	0,643	0,367

ANEXO B. (continuación)

		Dtr43	Dtr47	Dtr108	Dtr117
LZ	<i>N</i>	42	49	50	46
	<i>Na</i>	11	5	5	13
	<i>R</i>	109-126	122-130	108-123	131-161
	<i>A_c</i>	116	124	115	158
	<i>Frec A_c</i>	0,381	0,510	0,810	0,315
	<i>Rs</i>	7,594	4,263	3,910	8,891
	<i>He</i>	0,764	0,605	0,335	0,813
	<i>Ho</i>	0,619*	0,612	0,160**	0,544*
	<i>Fis</i>	0,192	-0,012	0,525	0,334
SE	<i>N</i>	38	47	46	37
	<i>Na</i>	10	7(1)	4	12
	<i>R</i>	109-126	122-132	113-123	125-158
	<i>A_c</i>	116	126	115	134
	<i>Frec A_c</i>	0,237	0,511	0,924	0,203
	<i>Rs</i>	7,757	5,168	2,585	9,533
	<i>He</i>	0,803	0,636	0,145	0,879
	<i>Ho</i>	0,579*	0,489*	0,109	0,649*
	<i>Fis</i>	0,281	0,232	0,251	0,264
MG	<i>N</i>	43	46	45	40
	<i>Na</i>	10	5	7	12
	<i>R</i>	109-126	122-130	107-149	125-161
	<i>A_c</i>	116	126	115	158
	<i>Frec A_c</i>	0,419	0,435	0,800	0,225
	<i>Rs</i>	6,923	4,501	5,147	9,884
	<i>He</i>	0,742	0,671	0,356	0,869
	<i>Ho</i>	0,419**	0,761	0,178**	0,450**
	<i>Fis</i>	0,438	-0,136	0,504	0,485
MÑ	<i>N</i>	46	50	49	48
	<i>Na</i>	10	5	5	15(1)
	<i>R</i>	109-126	122-130	107-123	125-164
	<i>A_c</i>	118	126	115	158
	<i>Frec A_c</i>	0,348	0,430	0,888	0,344
	<i>Rs</i>	7,146	4,258	3,322	9,892
	<i>He</i>	0,780	0,679	0,210	0,820
	<i>Ho</i>	0,435**	0,680	0,082**	0,354**
	<i>Fis</i>	0,445	-0,002	0,613	0,571

ANEXO B. (continuación)

		Dtr43	Dtr47	Dtr108	Dtr117
CA	<i>N</i>	32	50	46	31
	<i>Na</i>	10	6	4	12(1)
	<i>R</i>	105-126	122-132	113-123	125-173
	<i>A_c</i>	118	126	115	134
	<i>Frec A_c</i>	0,313	0,500	0,826	0,307
	<i>Rs</i>	8,779	4,304	3,226	10,014
	<i>He</i>	0,835	0,617	0,306	0,848
	<i>Ho</i>	0,531*	0,660	0,217*	0,645*
	<i>Fis</i>	0,368	-0,070	0,292	0,242
FU	<i>N</i>	43	50	48	48
	<i>Na</i>	11	5	3	13
	<i>R</i>	109-126	124-132	115-119	125-161
	<i>A_c</i>	116	124	115	158
	<i>Frec A_c</i>	0,346	0,470	0,885	0,271
	<i>Rs</i>	7,839	3,600	2,675	9,458
	<i>He</i>	0,778	0,594	0,210	0,838
	<i>Ho</i>	0,628	0,480	0,063**	0,417**
	<i>Fis</i>	0,195	0,193	0,705	0,505
GA	<i>N</i>	39	49	44	47
	<i>Na</i>	10	6	6	10
	<i>R</i>	109-126	122-132	107-149	125-161
	<i>A_c</i>	118	124	115	134/137
	<i>Frec A_c</i>	0,395	0,622	0,875	0,245
	<i>Rs</i>	7,744	4,430	4,054	8,427
	<i>He</i>	0,809	0,558	0,234	0,841
	<i>Ho</i>	0,744	0,490	0,114*	0,277**
	<i>Fis</i>	0,081	0,123	0,516	0,674
DE	<i>N</i>	45	49	46	46
	<i>Na</i>	9	5	5	15(1)
	<i>R</i>	109-126	122-130	107-149	125-167
	<i>A_c</i>	116	124	115	134
	<i>Frec A_c</i>	0,433	0,653	0,880	0,294
	<i>Rs</i>	6,326	3,651	3,628	10,470
	<i>He</i>	0,707	0,525	0,223	0,851
	<i>Ho</i>	0,400**	0,531	0,109*	0,522**
	<i>Fis</i>	0,437	-0,011	0,516	0,390

ANEXO B. (continuación)

		Dtr43	Dtr47	Dtr108	Dtr117
MA	<i>N</i>	44	50	49	45
	<i>Na</i>	9	6(1)	8(1)	14
	<i>R</i>	109-124	121-130	107-149	125-161
	<i>A_c</i>	118	124	115	137
	<i>Frec A_c</i>	0,330	0,610	0,857	0,300
	<i>Rs</i>	7,195	4,683	4,648	10,396
	<i>He</i>	0,786	0,573	0,265	0,850
	<i>Ho</i>	0,659*	0,500	0,082**	0,356**
	<i>Fis</i>	0,163	0,129	0,694	0,584

N: número de individuos; *Na*: número de alelos (alelos privados); *R*: rango de tamaño de los alelos en pares de bases; *A_c*: tamaño en pares de bases del alelo más común; *Frec A_c*: frecuencia del alelo más común; *Rs*: riqueza alélica basada en un tamaño muestral mínimo de 16 individuos; *He*: heterocigosidad esperada insesgada de Nei; *Ho*: heterocigosidad observada; *Fis*: coeficiente de endogamia; (*): significativo para un $\alpha=0,05$; (**): significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni

ANEXO C. Características de los *loci* microsatélite incluidos en la *Multiplex 3* y analizados en 17 localidades de la Península Ibérica

		Dtr90	Dtr273	Dtr301	Dtr371
AL	<i>N</i>	50	50	49	50
	<i>Na</i>	9	3	9	2
	<i>R</i>	126-152	108-113	120-138	119-120
	<i>A_c</i>	138	112	126	119
	<i>Frec A_c</i>	0,490	0,890	0,531	0,980
	<i>Rs</i>	5,880	2,732	6,240	1,540
	<i>He</i>	0,684	0,203	0,659	0,040
	<i>Ho</i>	0,680	0,100*	0,510	0,040
	<i>Fis</i>	0,006	0,511	0,227	-0,010
VC	<i>N</i>	49	50	48	48
	<i>Na</i>	10	4	10	2
	<i>R</i>	94-152	108-113	120-138	119-120
	<i>A_c</i>	138	112	126	119
	<i>Frec A_c</i>	0,480	0,880	0,698	0,958
	<i>Rs</i>	7,277	3,090	5,849	1,809
	<i>He</i>	0,708	0,222	0,494	0,081
	<i>Ho</i>	0,592	0,140*	0,375	0,083
	<i>Fis</i>	0,165	0,371	0,243	-0,033
LN	<i>N</i>	50	49	49	49
	<i>Na</i>	12	3	10	2
	<i>R</i>	94-152	108-113	120-141	119-120
	<i>A_c</i>	138	112	126	119
	<i>Frec A_c</i>	0,440	0,857	0,541	0,959
	<i>Rs</i>	7,261	2,877	6,622	1,800
	<i>He</i>	0,731	0,258	0,663	0,079
	<i>Ho</i>	0,700	0,245	0,449*	0,000*
	<i>Fis</i>	0,043	0,050	0,325	1,000
BQ	<i>N</i>	50	49	45	50
	<i>Na</i>	11	3	7	2
	<i>R</i>	94-152	108-113	120-138	119-120
	<i>A_c</i>	138	112	126	119
	<i>Frec A_c</i>	0,400	0,888	0,500	0,940
	<i>Rs</i>	7,979	2,744	4,799	1,908
	<i>He</i>	0,778	0,207	0,644	0,114
	<i>Ho</i>	0,660*	0,122*	0,533*	0,000**
	<i>Fis</i>	0,153	0,412	0,173	1,000

ANEXO C. (continuación)

		Dtr90	Dtr273	Dtr301	Dtr371
CR	<i>N</i>	46	47	46	47
	<i>Na</i>	8	4	9	2
	<i>R</i>	119-148	108-113	123-135	119-120
	<i>A_c</i>	138	112	126	119
	<i>Frec A_c</i>	0,467	0,819	0,609	0,883
	<i>Rs</i>	6,414	3,612	6,277	1,993
	<i>He</i>	0,716	0,320	0,595	0,209
	<i>Ho</i>	0,674	0,277	0,370**	0,064**
	<i>Fis</i>	0,060	0,137	0,381	0,697
VI	<i>N</i>	49	49	50	48
	<i>Na</i>	9	3	8	2
	<i>R</i>	126-152	108-113	120-138	119-120
	<i>A_c</i>	138	112	126	119
	<i>Frec A_c</i>	0,408	0,867	0,590	0,979
	<i>Rs</i>	6,905	2,857	5,772	1,558
	<i>He</i>	0,740	0,241	0,609	0,041
	<i>Ho</i>	0,796	0,225	0,640	0,042
	<i>Fis</i>	-0,076	0,070	-0,052	-0,011
BS	<i>N</i>	50	49	50	49
	<i>Na</i>	9	3	8	2
	<i>R</i>	119-152	108-113	120-138	119-120
	<i>A_c</i>	138	112	126	119
	<i>Frec A_c</i>	0,450	0,878	0,530	0,959
	<i>Rs</i>	7,128	2,764	6,346	1,800
	<i>He</i>	0,728	0,224	0,671	0,079
	<i>Ho</i>	0,680	0,204	0,600	0,041
	<i>Fis</i>	0,067	0,089	0,107	0,487
CL	<i>N</i>	50	50	47	49
	<i>Na</i>	9	3	9	2
	<i>R</i>	111-152	108-113	120-138	119-120
	<i>A_c</i>	138	112	126	119
	<i>Frec A_c</i>	0,420	0,790	0,489	0,990
	<i>Rs</i>	6,365	2,860	6,197	1,327
	<i>He</i>	0,738	0,351	0,685	0,020
	<i>Ho</i>	0,680	0,300	0,468*	0,020
	<i>Fis</i>	0,080	0,147	0,319	0,000

ANEXO C. (continuación)

		Dtr90	Dtr273	Dtr301	Dtr371
LZ	<i>N</i>	46	46	47	47
	<i>Na</i>	11	5	13	3
	<i>R</i>	119-152	108-116	114-141	104-120
	<i>A_c</i>	138	112	126	119
	<i>Frec A_c</i>	0,435	0,848	0,447	0,936
	<i>Rs</i>	7,256	3,744	8,399	2,223
	<i>He</i>	0,743	0,276	0,753	0,122
	<i>Ho</i>	0,739	0,174*	0,426**	0,043*
	<i>Fis</i>	0,006	0,373	0,438	0,653
SE	<i>N</i>	40	45	46	48
	<i>Na</i>	10	4	9	2
	<i>R</i>	111-148	108-116	120-138	119-120
	<i>A_c</i>	138	112	126	119
	<i>Frec A_c</i>	0,413	0,889	0,424	0,938
	<i>Rs</i>	7,130	2,903	6,853	1,919
	<i>He</i>	0,755	0,206	0,747	0,118
	<i>Ho</i>	0,725	0,156	0,304**	0,000**
	<i>Fis</i>	0,041	0,245	0,595	1,000
MG	<i>N</i>	47	49	48	50
	<i>Na</i>	9	4	7	3
	<i>R</i>	119-152	108-113	114-138	119-121
	<i>A_c</i>	138	112	126	119
	<i>Frec A_c</i>	0,543	0,837	0,510	0,970
	<i>Rs</i>	6,732	3,117	5,095	1,860
	<i>He</i>	0,670	0,288	0,654	0,059
	<i>Ho</i>	0,681	0,265*	0,500	0,060
	<i>Fis</i>	-0,016	0,081	0,237	-0,014
MÑ	<i>N</i>	49	49	48	50
	<i>Na</i>	11	3	8	3
	<i>R</i>	119-152	108-113	120-138	119-121
	<i>A_c</i>	138	112	126	119
	<i>Frec A_c</i>	0,469	0,796	0,490	0,950
	<i>Rs</i>	7,284	2,911	5,657	2,112
	<i>He</i>	0,727	0,346	0,684	0,097
	<i>Ho</i>	0,694	0,286	0,479*	0,060
	<i>Fis</i>	0,046	0,175	0,302	0,382

ANEXO C. (continuación)

		Dtr90	Dtr273	Dtr301	Dtr371
CA	<i>N</i>	44	48	49	49
	<i>Na</i>	11	6(1)	9	2
	<i>R</i>	111-148	103-116	120-138	119-120
	<i>A_c</i>	138	112	126	119
	<i>Frec A_c</i>	0,364	0,865	0,459	0,959
	<i>Rs</i>	8,068	3,909	6,451	1,800
	<i>He</i>	0,797	0,250	0,728	0,079
	<i>Ho</i>	0,818	0,229	0,551**	0,000*
	<i>Fis</i>	-0,027	0,084	0,245	1,000
FU	<i>N</i>	48	50	50	50
	<i>Na</i>	8	3	9	3(1)
	<i>R</i>	126-152	108-113	122-138	119-127
	<i>A_c</i>	138	112	126	119
	<i>Frec A_c</i>	0,469	0,840	0,540	0,940
	<i>Rs</i>	6,129	2,851	5,875	2,182
	<i>He</i>	0,701	0,283	0,641	0,115
	<i>Ho</i>	0,625	0,180*	0,380**	0,040*
	<i>Fis</i>	0,110	0,365	0,409	0,654
GA	<i>N</i>	50	50	49	49
	<i>Na</i>	9	4	8	1
	<i>R</i>	111-148	108-113	123-141	119
	<i>A_c</i>	138	112	126	119
	<i>Frec A_c</i>	0,540	0,720	0,469	1,000
	<i>Rs</i>	6,055	3,294	5,846	1,000
	<i>He</i>	0,655	0,446	0,701	0,000
	<i>Ho</i>	0,600	0,300*	0,633*	0,000
	<i>Fis</i>	0,085	0,329	0,098	-
DE	<i>N</i>	49	49	50	50
	<i>Na</i>	7	5	10(1)	3
	<i>R</i>	126-152	108-116	118-135	104-120
	<i>A_c</i>	138	112	126	119
	<i>Frec A_c</i>	0,653	0,633	0,540	0,980
	<i>Rs</i>	5,468	3,874	6,075	1,640
	<i>He</i>	0,544	0,548	0,656	0,040
	<i>Ho</i>	0,510	0,204**	0,420**	0,040
	<i>Fis</i>	0,062	0,630	0,362	-0,005

ANEXO C. (continuación)

		Dtr90	Dtr273	Dtr301	Dtr371
MA	<i>N</i>	47	49	48	49
	<i>Na</i>	8	5(1)	8	3
	<i>R</i>	126-148	107-113	120-135	104-121
	<i>A_c</i>	138	112	126	119
	<i>Frec A_c</i>	0,596	0,561	0,458	0,949
	<i>Rs</i>	6,463	3,874	5,320	2,248
	<i>He</i>	0,615	0,602	0,700	0,099
	<i>Ho</i>	0,681	0,143**	0,354**	0,020*
	<i>Fis</i>	-0,108	0,765	0,497	0,796

N: número de individuos; *Na*: número de alelos (alelos privados); *R*: rango de tamaño de los alelos en pares de bases; *A_c*: tamaño en pares de bases del alelo más común; *Frec A_c*: frecuencia del alelo más común; *Rs*: riqueza alélica basada en un tamaño muestral mínimo de 16 individuos; *He*: heterocigosidad esperada insesgada de Nei; *Ho*: heterocigosidad observada; *Fis*: coeficiente de endogamia; (*): significativo para un $\alpha=0,05$; (**): significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni

ANEXO D. Frecuencia absoluta de los 87 haplotipos del gen CitB tipo F en las catorce localidades estudiadas y porcentaje de individuos que portan cada haplotipo

	AL	BQ	CR	VI	BS	CL	LZ	SE	MG	MÑ	FU	GA	DE	MA	%
H1	13	13	19	17	16	18	14	18	11	16	13	12	11	6	50,64
H2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,26
H3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,26
H4	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0,77
H5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,26
H6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,26
H7	2	1	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1,80
H8	2	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1,29
H9	1	0	3	1	1	2	0	1	1	1	1	0	0	0	3,08
H10	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,51
H11	0	1	2	2	3	1	4	5	2	6	0	0	0	0	6,68
H12	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1,03
H13	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,26
H14	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1,03
H15	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,77
H16	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,26
H17	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,51
H18	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,51
H19	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,51
H20	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,26
H21	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1,03
H22	0	0	0	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1,03
H23	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,26
H24	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,26
H25	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,26
H26	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,77
H27	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,26
H28	0	0	2	2	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	2,06
H29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	3	5	3,34
H30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0,51
H31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	5	3	2,57
H32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,51
H33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,26
H34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0,51
H35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0,51
H36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,26
H37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,26
H38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,26
H39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,26
H40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,26
H41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,26
H42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,26
H43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,26

ANEXO D. (continuación)

	AL	BQ	CR	VI	BS	CL	LZ	SE	MG	MÑ	FU	GA	DE	MA	%
H44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,26
H45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,26
H46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,26
H47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,26
H48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,26
H49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,26
H50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,26
H51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,26
H52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,26
H53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,26
H54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,26
H55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,26
H56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,26
H57	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0,51
H58	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,26
H59	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,26
H60	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,26
H61	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0,51
H62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,51
H63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,26
H64	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0,77
H65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,26
H66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,26
H67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,26
H68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,26
H69	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,26
H70	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,26
H71	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,26
H72	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,26
H73	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,26
H74	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,26
H75	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,26
H76	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,51
H77	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,26
H78	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,26
H79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,26
H80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,26
H81	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,26
H82	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,26
H83	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,26
H84	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,26
H85	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,26
H86	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,26
H87	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,26

ANEXO E. Frecuencia absoluta de los 51 haplotipos del gen CitB tipo M en las catorce localidades estudiadas y porcentaje de individuos que portan cada haplotipo

	AL	BQ	CR	VI	BS	CL	LZ	SE	MG	MÑ	FU	GA	DE	MA	%
H1	9	9	13	7	7	11	10	6	6	10	5	2	0	0	52,20
H2	1	3	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3,85
H3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,65
H4	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1,65
H5	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,10
H6	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,10
H7	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1,10
H8	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,10
H9	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,55
H10	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1,10
H11	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,55
H12	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,55
H13	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,55
H14	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,55
H15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,55
H16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,55
H17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	6	6,59
H18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,55
H19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1,10
H20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,55
H21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,55
H22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	2,75
H23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	2,20
H24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1,10
H25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,55
H26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,55
H27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,55
H28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,55
H29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,55
H30	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,55
H31	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,55
H32	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,55
H33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,55
H34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,55
H35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,55
H36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,55
H37	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,55
H38	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,55
H39	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,55
H40	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1,10
H41	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1,10
H42	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,55

ANEXO E. (continuación)

	AL	BQ	CR	VI	BS	CL	LZ	SE	MG	MÑ	FU	GA	DE	MA	%
H43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,55
H44	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,55
H45	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,55
H46	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,55
H47	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,55
H48	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,55
H49	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,55
H50	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,55
H51	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,55

ANEXO F. Frecuencia absoluta de los 109 haplotipos del gen COI en las catorce localidades estudiadas y porcentaje de individuos que portan cada haplotipo

	AL	BQ	BS	CR	CL	DE	FU	GA	LZ	MA	MG	MN	SE	VI	%
H1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H2	11	10	14	9	14	4	7	5	12	1	11	9	12	8	29,88
H3	4	3	4	1	1	1	2	1	4	0	4	0	3	2	7,06
H4	2	2	3	3	2	0	0	0	7	1	3	8	4	5	9,41
H5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H7	1	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1,18
H8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,47
H9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H10	2	0	2	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2,82
H11	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0,71
H12	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1,18
H13	1	0	2	2	2	1	0	0	0	0	1	0	0	1	2,35
H14	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	2	1	0	1,88
H15	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,94
H16	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0,71
H17	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H18	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H19	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H20	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H21	0	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1,65
H22	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	1	1,18
H23	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H24	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H25	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H26	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,71
H27	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H28	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,47
H29	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H30	0	0	2	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1,18
H31	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,47
H32	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,71
H33	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H34	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H35	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H36	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0,71
H37	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H38	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H39	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H40	0	0	0	0	0	5	0	2	0	8	0	0	0	0	3,53
H41	0	0	0	0	0	6	0	4	0	2	0	0	0	0	2,82
H42	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H43	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,24

ANEXO F. (continuación)

	AL	BQ	BS	CR	CL	DE	FU	GA	LZ	MA	MG	MN	SE	VI	%
H44	0	0	0	0	0	6	0	3	0	5	0	0	0	0	3,29
H45	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0,71
H46	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H47	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H48	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0,71
H49	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H50	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H51	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0,71
H52	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H53	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	1	0	0,94
H54	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H55	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0,47
H56	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H57	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H58	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H59	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H60	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H61	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H62	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H63	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0,47
H64	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H65	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H66	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H67	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H68	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,24
H69	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0,47
H70	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,47
H71	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,24
H72	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,24
H73	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,47
H74	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,24
H75	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0,47
H76	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,24
H77	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,24
H78	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,24
H79	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,24
H80	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,47
H81	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0,47
H82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,24
H83	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,24
H84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,24
H85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,24
H86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,24
H87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,24

ANEXO F. (continuación)

	AL	BQ	BS	CR	CL	DE	FU	GA	LZ	MA	MG	MN	SE	VI	%
H88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,24
H89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,24
H90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,24
H91	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,24
H92	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,24
H93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,24
H94	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,24
H95	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,24
H96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,24
H97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,24
H98	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,24
H99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,24
H100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,24
H101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0,47
H102	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0,47
H103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,24
H104	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,24
H105	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,24
H106	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,24
H107	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,24
H108	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,24
H109	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,24

ANEXO G. Características de los *loci* microsatélite analizados en la población natural, lote de reproductores y semilla

<i>Loci</i>		Población natural	Reproductores	Semilla				Total	Global
				T1	T2	T3	T4		
Dtr47	<i>N</i>	50	360	394	100	100	98	692	1102
	<i>Na</i>	6	8	6	5	6	5	6	8
	<i>Rs</i> ₁	5,186	4,977	4,118	4,192	5,150	4,214	-	4,638
	<i>Rs</i> ₂	5,329	5,082	-	-	-	-	4,432	4,733
	<i>He</i>	0,605	0,609	0,582	0,576	0,636	0,595	0,592	0,599
	<i>Ho</i>	0,600	0,589	0,564	0,530	0,640	0,582	0,572	0,579
	<i>Fis</i>	0,008	0,033	0,031	0,080	-0,006	0,023	0,034	0,033
Dtr53	<i>N</i>	37	352	381	96	89	43	609	998
	<i>Na</i>	15	30	25	21	18	15	27	31
	<i>Rs</i> ₁	14,127	18,420	14,964	14,157	13,700	14,038	-	16,410
	<i>Rs</i> ₂	14,582	19,106	-	-	-	-	15,336	16,983
	<i>He</i>	0,832	0,882	0,858	0,842	0,846	0,863	0,856	0,865
	<i>Ho</i>	0,811	0,759**	0,811**	0,802	0,764*	0,861	0,806**	0,790**
	<i>Fis</i>	0,025	0,140	0,055	0,047	0,098	0,003	0,058	0,087
Dtr70	<i>N</i>	45	354	395	100	100	44	639	1038
	<i>Na</i>	6	7	7	6	6	6	7	8
	<i>Rs</i> ₁	5,661	5,511	5,533	5,271	5,934	5,929	-	5,654
	<i>Rs</i> ₂	5,742	5,591	-	-	-	-	5,776	5,727
	<i>He</i>	0,749	0,719	0,697	0,686	0,755	0,680	0,704	0,715
	<i>Ho</i>	0,644*	0,664	0,676	0,730	0,730	0,591	0,687	0,677
	<i>Fis</i>	0,141	0,077	0,030	-0,065	0,033	0,132	0,025	0,052

ANEXO G. (continuación)

<i>Loci</i>		Población natural	Reproductores	T1	T2	Semilla	T4	Total	Global
						T3			
Dtr86	<i>N</i>	34	239	243	59	50	31	383	656
	<i>Na</i>	10	16	12	9	8	6	12	18
	<i>Rs</i> ₁	9,734	8,495	8,202	8,129	7,870	6,000	-	8,470
	<i>Rs</i> ₂	10,000	8,710	-	-	-	-	8,257	8,669
	<i>He</i>	0,835	0,814	0,812	0,782	0,807	0,726	0,803	0,809
	<i>Ho</i>	0,618*	0,728*	0,774**	0,678**	0,640*	0,742	0,739**	0,729**
	<i>Fis</i>	0,264	0,106	0,047	0,134	0,209	-0,022	0,080	0,099
Dtr90	<i>N</i>	49	358	390	100	100	97	687	1094
	<i>Na</i>	9	11	9	9	8	9	10	11
	<i>Rs</i> ₁	8,452	8,122	7,328	6,992	6,585	7,751	-	7,847
	<i>Rs</i> ₂	8,626	8,299	-	-	-	-	7,525	8,009
	<i>He</i>	0,740	0,748	0,730	0,744	0,694	0,752	0,730	0,738
	<i>Ho</i>	0,796	0,648**	0,644**	0,580**	0,610*	0,670**	0,633**	0,645**
	<i>Fis</i>	-0,076	0,133	0,118	0,221	0,121	0,109	0,132	0,126
Dtr108	<i>N</i>	49	339	350	95	88	89	622	1010
	<i>Na</i>	7	8	6	5	6	5	6	10
	<i>Rs</i> ₁	5,835	5,167	4,806	4,358	4,977	4,362	-	5,189
	<i>Rs</i> ₂	6,047	5,348	-	-	-	-	4,813	5,340
	<i>He</i>	0,458	0,261	0,315	0,224	0,297	0,190	0,281	0,285
	<i>Ho</i>	0,122**	0,077**	0,097**	0,053**	0,091**	0,090**	0,088**	0,086**
	<i>Fis</i>	0,735	0,706	0,691	0,766	0,695	0,529	0,686	0,698

ANEXO G. (continuación)

<i>Loci</i>		Población natural	Reproductores	Semilla				Total	Global
				T1	T2	T3	T4		
Dtr117	<i>N</i>	49	343	365	95	96	96	652	1044
	<i>Na</i>	14	16	15	13	13	13	15	17
	<i>Rs</i> ₁	12,448	12,085	11,898	10,896	11,093	9,759	-	12,135
	<i>Rs</i> ₂	12,829	12,380	-	-	-	-	11,859	12,437
	<i>He</i>	0,841	0,846	0,850	0,860	0,850	0,845	0,853	0,851
	<i>Ho</i>	0,633*	0,487**	0,518**	0,484**	0,542**	0,531**	0,518**	0,513**
	<i>Fis</i>	0,250	0,425	0,391	0,438	0,364	0,373	0,392	0,397
Dtr126	<i>N</i>	38	305	313	90	82	36	521	864
	<i>Na</i>	5	18	13	9	9	7	13	18
	<i>Rs</i> ₁	4,784	10,332	7,754	7,354	6,929	6,722	-	8,659
	<i>Rs</i> ₂	4,885	10,722	-	-	-	-	7,714	8,949
	<i>He</i>	0,622	0,768	0,745	0,727	0,742	0,797	0,747	0,755
	<i>Ho</i>	0,316**	0,282**	0,361**	0,289**	0,305**	0,472**	0,347**	0,323**
	<i>Fis</i>	0,496	0,633	0,516	0,604	0,591	0,411	0,535	0,572
Dtr174	<i>N</i>	40	319	360	99	94	95	648	1007
	<i>Na</i>	9	9	8	7	7	6	8	10
	<i>Rs</i> ₁	8,654	7,040	5,952	6,529	6,805	5,689	-	6,996
	<i>Rs</i> ₂	8,802	7,187	-	-	-	-	6,299	7,147
	<i>He</i>	0,612	0,639	0,632	0,665	0,725	0,510	0,640	0,641
	<i>Ho</i>	0,225**	0,314**	0,333**	0,465**	0,340**	0,168**	0,330**	0,321**
	<i>Fis</i>	0,635	0,510	0,473	0,302	0,532	0,671	0,484	0,500

ANEXO G. (continuación)

<i>Loci</i>		Población natural	Reproductores	Semilla				Total	Global
				T1	T2	T3	T4		
Dtr199	<i>N</i>	44	357	396	100	100	99	695	1096
	<i>Na</i>	5	10	7	6	7	4	8	10
	<i>Rs</i> ₁	4,618	5,502	4,738	4,719	5,261	3,489	-	4,991
	<i>Rs</i> ₂	4,723	5,669	-	-	-	-	4,786	5,113
	<i>He</i>	0,322	0,378	0,306	0,334	0,320	0,214	0,299	0,327
	<i>Ho</i>	0,318	0,375	0,313	0,350	0,350	0,212*	0,309*	0,331*
	<i>Fis</i>	0,012	0,007	-0,024	-0,049	-0,094	0,009	-0,035	-0,013
Dtr323	<i>N</i>	46	362	394	100	99	96	689	1097
	<i>Na</i>	3	6	5	6	4	4	6	7
	<i>Rs</i> ₁	2,674	4,347	3,603	3,811	3,930	3,404	-	3,971
	<i>Rs</i> ₂	2,739	4,458	-	-	-	-	3,758	4,053
	<i>He</i>	0,198	0,249	0,260	0,187	0,392	0,448	0,303	0,282
	<i>Ho</i>	0,130	0,232	0,228*	0,170	0,374*	0,594*	0,292	0,265
	<i>Fis</i>	0,344	0,067	0,120	0,091	0,047	-0,327	0,037	0,058
Global	<i>Na</i>	8,091	12,636	10,273	8,727	8,364	7,273	10,727	
	<i>Rs</i> ₁	7,470	8,182	7,172	6,946	7,112	6,487	-	7,228
	<i>Rs</i> ₂	7,664	8,414	-	-	-	-	7,323	7,800
	<i>He</i>	0,619	0,628	0,617	0,602	0,642	0,602	0,619	
	<i>Ho</i>	0,474	0,469	0,484	0,466	0,490	0,501	0,484	
	<i>Fis</i>	0,237**	0,255**	0,216**	0,227**	0,239**	0,169**	0,218**	

N: número de individuos; *Na*: número de alelos; *Rs*: riqueza alélica calculada en base a 31 individuos (*Rs*₁) y 34 individuos (*Rs*₂); *He*: heterocigosidad esperada insesgada de Nei; *Ho*: heterocigosidad observada; *Fis*: coeficiente de endogamia; (*) significativo para un $\alpha=0,05$; (**): significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni

PUBLICACIONES



Characterization of nineteen microsatellite markers and development of multiplex PCRs for the wedge clam *Donax trunculus* (Mollusca: Bivalvia)

Ana Nantón · Alberto Arias-Pérez ·
 Josefina Méndez · Ruth Freire

Received: 15 March 2013 / Accepted: 9 May 2014 / Published online: 23 May 2014
 © Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract The wedge clam *Donax trunculus* is an Atlantic-Mediterranean warm-temperate species found from Senegal to the northern coast of France, including the Mediterranean and Black Sea. It is commercially exploited in several European countries and constitutes an important fishing resource due to its high economical value. To contribute to its conservation and management, nineteen microsatellite markers were isolated from two enriched genomic libraries. These loci were characterized in 30 clams from a single population from northwest Spain. The number of alleles per locus ranged from 2 to 17 and observed and expected heterozygosity varied from zero to 0.714 and from 0.078 to 0.950, respectively. Linkage disequilibrium was not detected and nine loci were in agreement with Hardy–Weinberg equilibrium. Fifteen polymorphic markers were arranged into three multiplex PCR sets to reduce both time and cost of microsatellite genotyping. This is the first time that polymorphic microsatellite markers have been reported for *D. trunculus*. These new markers provide a valuable resource for future population genetics studies and management and culture of this species.

Keywords *Donax trunculus* · Microsatellite markers · Multiplex PCR · Genetic variation

Introduction

The wedge clam *Donax trunculus* is a bivalve of the Donacidae family. It is an Atlantic-Mediterranean warm-

temperate species that has been recorded from Senegal to France in the Atlantic Ocean [1] and also has been found in the Mediterranean and the Black Sea [2]. This species is commercially exploited in Portugal [3–5], Italy [6], France [7] and Spain [8, 9], and constitutes an important fishing resource due to its high economical value. In Galicia (northwest coast of Spain) this species has been subjected to intense exploitation. Wild stocks have decreased dramatically in this region and they currently are restricted to specific areas of the north coast [10]. Due to their decreased distribution commercial harvesting has declined since 2003 [9]. The production of this clam could be enhanced through effective management of natural and hatchery stocks, including translocations of individuals from other regions. Such efforts should be guided by genetic studies to prevent loss of genetic diversity that threaten the evolutionary potential of wild populations [11]. Furthermore, information about population differentiation, gene flow patterns and existence of rare alleles is required to design conservation and population management strategies [12]. However, population genetic studies in *D. trunculus* are nonexistent.

Microsatellites are one of the most popular markers used to explore genetic diversity and population structure and they have been developed in different bivalve species [13–15]. They consist of tandem repeat motifs of 1–6 bp and have been found in all genomes. Typically, these markers are highly variable, behave as selectively neutral, show a codominant mode of inheritance, can be easily amplified by PCR, and are highly reproducible. Their most important drawback is that they usually need to be isolated de novo for each species, since they are not often conserved across species.

The aims of this study were to isolate and characterize the first microsatellite markers in *D. trunculus*, as well as the optimization of multiplex PCRs for genetic studies to

A. Nantón (✉) · A. Arias-Pérez · J. Méndez · R. Freire
 Grupo Xenomar, Departamento de Biología Celular e Molecular,
 Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña, Campus de A
 Coruña, 15071 A Coruña, Spain
 e-mail: ana.nanton@udc.es

help manage the exploitation of this bivalve. Multiplex PCRs were developed to analyze several microsatellite loci simultaneously in one single reaction. This technique reduces the time and cost associated with microsatellite genetic analyses. Moreover, multiplex PCR decreases the repeated manipulation of large numbers of samples and, therefore, the risk of sample mishandling [16].

Materials and methods

Specimen collection and DNA extraction

Samples of *D. trunculus* were collected from Vilarrube in northwest Spain (Atlantic coast). DNA was extracted from ethanol-preserved foot according to either Fernández-Tajes and Méndez [17] or the Chelex-100 based method developed by Walsh et al. [18].

Enriched library construction and analysis

Microsatellite markers were isolated from two enriched genomic libraries (I and II) constructed according to Billote et al. [19], with minor modifications. Two micrograms of genomic DNA, extracted following Fernández-Tajes and Méndez [17], were digested with *AluI* restriction enzyme (Roche Applied Science). The DNA fragments obtained (1 µg) were ligated to the linkers Rsa21 (5'-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3') and Rsa25 (5'-pTAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA-3') described by Edwards et al. [20], adding 0.01 µM of each linker, 4.2 U of T4 DNA ligase (Promega) and 2× recommended buffer in a final volume of 200 µl. To increase the amount of product and check the ligation, a PCR was carried out using Rsa21 linker as primer. PCR reaction contained 5 µl of the ligation product, 1× PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 mM of each dNTP, 1 µM of Rsa21 primer, and 0.625 U of *Taq* polymerase (Roche Applied Science) in a final volume of 25 µl. PCR was performed with an initial denaturation of 1 min at 95 °C, followed by 25 cycles of 40 s at 94 °C, 1 min at 60 °C and 2 min at 72 °C; finally, an extension step of 5 min at 72 °C. Next, the fragments were selected by hybridization using 5'-biotinylated microsatellite oligonucleotide probes: (GT)₈, (ATC)₁₀ and (CTGT)₆ probes for library I and (GATA)₆ and (ACC)₇ for library II. Two slightly different approaches were used in each genomic library. In I, hybridization was done using three probes together and in II each probe was hybridized separately. The same hybridization protocol was used in both libraries: after denaturing PCR fragments, 0.12 µM of each probe was added to 100 µl of PCR product with 0.5× SSC and 0.1 % SDS in a final volume of 521 µl, and the mix was incubated for 20 min at room temperature. The DNA

hybridized to the probe/probes was captured by adding 100 µl of washed streptavidin-coated magnetic beads (Promega) followed by a 10 min incubation at room temperature. Residual unattached DNA was removed through three washes with 300 µl of 0.1× SSC, 0.1 % SDS at room temperature. DNA fragments were eluted by adding 250 µl of sterile milliQ H₂O. Enriched DNA fragments were amplified with Rsa21 primer. PCR reaction mixtures contained 2 µl of DNA fragments, 1× PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 mM of each dNTP, 1 µM of Rsa21 primer, and 0.625 U of *Taq* polymerase (Roche Applied Science) in a final volume of 25 µl. PCR was performed with an initial denaturation of 1 min at 95 °C, followed by 20 cycles of 40 s at 94 °C, 30 s at 60 °C and 40 s at 72 °C; finally, an extension step of 5 min at 72 °C. In library II PCR products of the two probes were joined before cloning. The cloning protocol was the same for both libraries. PCR products were ligated into the yT&A[®] cloning vector and transformed into *Escherichia coli* ECOS[™] DH5α strain competent cells using yT&A[®] Cloning Vector Kit (Yeastern Biotech). Recombinant clones were amplified with M13 forward and reverse primers to assess the size of the insert. PCR reaction mixtures contained 5 µl of recombinant cells, 1× PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.6 µM of each primer, and 0.3 U of *Taq* polymerase (Roche Applied Science) in a final volume of 12.5 µl. The PCR was performed under the following conditions: an initial denaturation of 10 min at 94 °C; 30 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C and 1 min at 72 °C; and a final extension of 10 min at 72 °C. PCR products were sequenced using either a forward or reverse M13 primer at the Molecular Biology Unit of the University of A Coruña (Spain). The similarity between the sequenced clones was checked by means of an all-against-all *blastn* analysis using the program MicroFamily-WIN [21]. Sequences were analyzed for the presence of microsatellites with the program Tandem Repeats Finder [22].

Detection of microsatellite polymorphism and genotyping

Oligonucleotide primers flanking the microsatellite regions were designed using the program Primer3 [23]. Initial optimization reactions, when necessary, were carried out in a gradient thermal cycler. Approximately 50 ng of Chelex-extracted DNA were used in a reaction volume of 12.5 µl containing 0.3 U of *Taq* polymerase (Roche Applied Science) in 1× PCR buffer, 0.2 mM of each dNTP, 0.24 µM of each primer and MgCl₂ ranging from 1.5 to 2.5 mM. The thermal cycler protocol consisted of an initial denaturation of 5 min at 95 °C, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 56–60 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s, and a final

extension of 10 min at 72 °C. PCR products were checked in 2 % agarose gels in order to assess their polymorphism. Once the optimal MgCl_2 concentration and annealing temperature were established, microsatellite loci were individually amplified in 30 individuals from Vilarrube. PCR amplifications were carried out as described above but labeling the 5' end of one of the primers with the 6-FAM fluorescent dye. Amplified PCR products were run on an ABI PRISM 3130 xl Genetic Analyzer and the allele scoring was performed with GeneMapper v.3.7 (Applied Biosystems).

Data analysis

Number of alleles, observed heterozygosity (H_o) and unbiased expected heterozygosity (H_e) of Nei [24] were calculated with the Genetix software v.4.03 [25]. Tests for agreement with Hardy–Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium between pairs of loci were carried out with the Genepop v.4.0 software [26]. When multiple tests were performed significance values were adjusted using sequential Bonferroni correction [27]. The program MicroChecker v.2.2.0.3 [28] was used to examine the microsatellite data for evidence of null alleles whose frequency was estimated following Brookfield [29].

Multiplex PCR optimization

Multiplex Manager v1.1 program [30] was used to combine the polymorphic microsatellite loci into multiplex PCR reactions. This software uses prior marker information to minimize the total number of reactions, maximize the spacing between markers and minimize the variance of annealing temperature in each reaction. In multiplex PCR amplifications, 80 ng of Chelex-extracted DNA were used in a reaction volume of 12.5 μl with 1 \times Qiagen Multiplex PCR Master Mix (containing HotStarTaq[®] polymerase, 3 mM MgCl_2 and dNTPs) and the corresponding primer mix (see below). The thermal cycler protocol consisted of 95 °C 15 min, followed by 35 cycles of 94 °C 30 s, 57–60 °C 90 s, 72 °C 90 s, and then 72 °C 10 min. Primer concentration was adjusted from an initial value of 0.2 μM to obtain optimal amplification and similar fluorescent signals. Chelex-extracted DNA from 50 individuals from Vilarrube was amplified by multiplex PCR and PCR products were genotyped using the program GeneMapper. Genetic variation for multiplex PCR was examined as described above.

Results

The two enriched libraries constructed yielded 783 (I:377; II:406) recombinant colonies. A total of 589 (I:245; II:344)

were sequenced, being 500 unique (I:199; II:301) and containing 198 at least one microsatellite motif (I:107; II:91). Primers were designed for the 97 microsatellites that showed suitable flanking regions. Nineteen of them yielded satisfactory amplifications with a polymorphic pattern.

The microsatellite loci showed high variation in their polymorphism (Table 1), with number of alleles per locus ranging from 2 to 17. The observed and expected heterozygosity varied between 0 and 0.714 and between 0.078 and 0.950, respectively, and the F_{IS} value ranged from -0.102 to 1. After sequential Bonferroni correction, nine loci conformed to Hardy–Weinberg equilibrium, whereas the other ten (Dtr17, Dtr20, Dtr46, Dtr53, Dtr86, Dtr108, Dtr126, Dtr174, Dtr273, Dtr285) showed significant heterozygote deficiency. The analysis with the program MicroChecker showed evidence of null alleles in these ten loci, with frequencies ranging from 0.109 to 0.277. No significant linkage disequilibrium was detected between loci.

Three multiplex PCRs were designed using the program Multiplex Manager. Initially, 17 of the 19 polymorphic microsatellite loci were arranged into three multiplex PCRs of eight (Multiplex 1), five (Multiplex 2) and four (Multiplex 3) loci each, and tested for amplification. After adjusting primer concentration, removing and replacing non-amplifying loci under the tested conditions, a total of 15 loci were arranged into the multiplex PCRs (Table 2). Results of multiplex PCR amplification of individuals from Vilarrube (Table 3) were similar to those obtained in monolocus PCR (Table 1).

Discussion

Donax trunculus constitutes an important resource in some European areas due to its high economical value. Galician estuaries, in the northwest coast of Spain, are ecosystems of high biological productivity and constitute ideal habitats for growth and culture of this species. However, wild stocks of this species are in decline. For this reason, the study of its genetic background in Galician populations is the first step to evaluate the resource's state and to develop conservation and management strategies. Nevertheless, until now, genetic markers for population genetic assessment of *D. trunculus* were not available. In this work, we isolated for the first time microsatellite markers and presented estimates of genetic variability at these loci for the wedge clam.

The two enriched libraries constructed allowed us to identify 19 microsatellite loci in the wedge clam. The redundancy, commonly observed when enriched procedures are employed [31] was moderate (15 %), so the protocol used was proven efficient for marker

Table 1 Characteristics of the 19 microsatellite loci identified in the wedge clam *D. trunculus*

Locus	Motif	Primer sequence (5′–3′)	MgCl ₂	T _a (°C)	N	Na	Size range (pb)	H _o	H _e	Null freq.	F _{IS}
Dtr17	(AT) ₄ GT CAT AA AT AT AA AT(TG) ₁₁	F: ACTCACAGCCTTGTGGGATG R: GCGGCGGTGACTTAGTTAAT	2.0	58	25	8	104–238	0.400	0.718	0.178	0.448**
Dtr20	(AC) ₂ GC (AC) ₁₄	F: CACACAAGGGGACTCTTAAAATG R: AACAGACTGGGCAAACACAA	1.5	60	20	17	86–126	0.500	0.940	0.217	0.474**
Dtr43	(ACAG) ₄	F: TCACAAGGTATGGTCGGACA R: CAGAGTATGCTGGGCGATTT	1.5	60	27	5	109–126	0.519	0.549	–	0.057
Dtr46	(CA) ₈	F: TAAGTCCCTAAAGCGCAAGG R: CAGGTATTTATGGCGCTGCT	1.5	60	25	8	92–104	0.440	0.831	0.206	0.476**
Dtr47	(TG) ₈	F: GCCAAAGGAAAGAGGATAAATG R: TGCTAACTCATCTGTGAGTGACTATG	2.0	60	28	6	122–132	0.714	0.649	–	–0.102
Dtr53	(GT) ₃ AT (GT) ₃ AGA GG GT GG AT TT (GT) ₁₁	F: GGAGAGCAAATGTTATGACAAG R: ACATGGGCTTAGGACAGGTT	2.5	60	23	6	200–417	0.348	0.749	0.222	0.541**
Dtr70	(TGTC) ₅	F: CCCCTTTTCTGGGCATTATT R: TGCGCTTACAAGAAATGTGG	1.5	60	29	6	92–116	0.690	0.750	–	0.082
Dtr86	(GACA) ₄	F: TCAAATTAGAGAGCGGACCAA R: CCATATTGTGTATGGGAGACA	1.5	60	30	11	72–108	0.667	0.886	0.109	0.251**
Dtr90	(AGAC) ₅ ATAT (GGAT) ₂ GGTT GGAC (AGAC) ₃	F: GTGTGAAAACTGTTAGAGTTATCGTG R: AGATGCTGCAGCCCTTTAGT	1.5	60	28	5	126–152	0.536	0.693	–	0.230
Dtr108	(GACA) ₄	F: TGTCTTCTACTGCGGATTCGT R: GGGCTAATTGCTTTGCTCCT	1.5	60	30	5	107–149	0.200	0.353	0.109	0.438**
Dtr117	(ATC) ₇	F: TCTCAACAGACAATTAGAGGTAGGC R: TGCCCGCTGTTCTTATTAGG	1.5	60	29	9	131–161	0.690	0.807	–	0.148
Dtr126	(GACA) ₄ GATT (GACA) ₃ GATG (GACA) ₂	F: CCCAATGGCCTCAAATAGTG R: CCCATCATGATCAGTAATCACC	1.5	60	29	6	184–195	0.414	0.720	0.172	0.430**
Dtr174	(ACAG) ₃	F: GCAATGTTAAAGTTGCGTTGTG R: CTTTGCTTTTCTTTGGTACCTAGC	1.5	60	27	10	79–135	0.185	0.652	0.277	0.720**
Dtr199	(ACAG) ₅	F: GGACACATGATGATAAAGGACA R: TCCATCCCAGTGCTACTTACC	1.5	60	29	5	170–193	0.241	0.226	–	–0.068
Dtr273	(TAT) ₃	F: TGC GTTTGAGGCATTTGTTA R: GCGGCTAATACTGTTGTTGTT	1.5	60	22	3	108–113	0.136	0.458	0.215	0.707**
Dtr285	(TG) ₁₀ GG GG TG GG (TG) ₇	F: CCAAACAGCATTTGTTTCAA R: TTTCTAATGGAAAATCCAAACA	2.0	56	17	16	86–132	0.588	0.950	0.174	0.388**
Dtr301	(ATC) ₅	F: CAGCGATTGTTGACGAAAGA R: CGCAAACCATCGTGAATA	1.5	60	27	7	120–138	0.482	0.596	–	0.195
Dtr323	(AAC) ₃	F: AGAACAACCAACAACAGCCTA R: AGATGATTTGGCGGAAGATG	1.5	60	26	3	129–165	0.192	0.271	–	0.294
Dtr371	(GACA) ₃	F: TGCACATCTACATTTCCCTTGA R: CCCGCAACAAAGTTTGTAG	1.5	60	25	2	119–120	0.000	0.078	–	1.000*

Significant departure from Hardy–Weinberg equilibrium at $P < 0.05$ (*) or after sequential Bonferroni correction (**)

T_a annealing temperature, N number of individuals, Na number of alleles, H_o and H_e observed and expected heterozygosity, respectively, Null freq. estimated frequency of null alleles, F_{IS} inbreeding coefficient

Table 2 Characteristics of the multiplex PCRs (1, 2, 3) tested in *D. trunculus*

Multiplex	Marker	Fluorescent dye	Primer pair concentration (μM)	T_a (°C)
1	Dtr53	FAM	0.25	57
	Dtr70	FAM	0.20	
	Dtr86	VIC	0.30	
	Dtr126	VIC	0.25	
	Dtr174	NED	0.20	
	Dtr199	PET	0.15	
	Dtr323	FAM	0.20	
2	Dtr47	VIC	0.20	60
	Dtr117	FAM	0.20	
	Dtr43	PET	0.20	
	Dtr108	NED	0.10	
3	Dtr90	PET	0.20	58
	Dtr301	VIC	0.15	
	Dtr273	NED	0.10	
	Dtr371	FAM	0.15	

Table 3 Characteristics of loci arranged in multiplex PCRs (1, 2, 3) tested in a sample of *D. trunculus* from Vilarrube

Multiplex	Marker	N	Na	H_o	H_e
1	Dtr53	37	15	0.811	0.832
	Dtr70	45	6	0.644	0.749*
	Dtr86	34	10	0.618	0.835*
	Dtr126	38	5	0.316	0.622**
	Dtr174	40	9	0.225	0.612**
	Dtr199	44	5	0.318	0.322
	Dtr323	46	3	0.130	0.198
2	Dtr47	50	6	0.600	0.605
	Dtr117	49	14	0.633	0.841*
	Dtr43	47	10	0.660	0.783
	Dtr108	49	7	0.122	0.458**
3	Dtr90	49	9	0.796	0.740
	Dtr301	50	8	0.640	0.609
	Dtr273	49	3	0.225	0.241
	Dtr371	48	2	0.042	0.041

Significant departure from Hardy–Weinberg equilibrium at $P < 0.05$ (*) or after sequential Bonferroni correction (**)

N number of individuals, Na number of alleles, H_o and H_e observed and expected heterozygosity, respectively

development in this species. The number of polymorphic microsatellite loci observed with respect to the total sequences examined in *D. trunculus* (3.8 %) is higher than that obtained by enriched libraries constructed from other bivalves, such as the oyster *Crassostrea virginica* (2.4 %) [32] and the pearl oyster *Pinctada maxima* (0.2 %) [33], but lower than that yielded in the cockle

Cerastoderma edule (12.2 %) [13] and in the queen scallop *Aequipecten opercularis* (6.0 %) [34]. Several factors may account for these isolation efficiency differences, including microsatellite frequency within the genome of the studied species and structure of the microsatellites and their flanking regions [35–38]. Moreover, different studies have proven it difficult to develop reliable molecular markers for molluscs [32, 39].

The microsatellite loci characterized for *D. trunculus* in this study showed a variable level of genetic variation. The number of alleles ranged from two for locus Dtr371 to 17 for locus Dtr20. These values were within the range observed for other bivalve species such as *Cristaria plicata* (4–18) [40] and *Mimachlamys varia* (4–16) [41], but lower than the values found in *A. opercularis* (9–86) [34] and *Crassostrea ariakensis* (2–36) [42]. On the other hand, observed and expected heterozygosity values varied between 0–0.714 and 0.078–0.950, respectively. This result is in agreement with the variability levels of this type of markers in other clams [14].

Heterozygote deficits relative to Hardy–Weinberg equilibrium were observed in ten loci after sequential Bonferroni correction. There have been many reports of heterozygote deficiency in natural populations of bivalve molluscs analyzed with DNA markers such as microsatellites [15, 43]. Different causes may explain this phenomenon such as the Wahlund effect, inbreeding, selection and null alleles [44]. Since MicroChecker software detected the presence of null alleles at all loci deviating from Hardy–Weinberg equilibrium, these alleles are most likely the cause of the heterozygote deficiency observed in our study. Null alleles are caused by mutations in the primer annealing sites that prevent amplification of affected alleles. The presence of null alleles creates false homozygotes and increases the estimated levels of homozygosity. They have been found in most taxa and seem to be particularly common in species with large effective population sizes [45], including many bivalve species such as clams [46] and oysters [43]. In fact, the null allele frequencies obtained here (0.109–0.277) are comparable to those estimated from natural populations of other bivalves [47, 48].

To facilitate large-scale population studies three multiplex PCRs were optimized. However, this method is technically more difficult than single-locus amplifications. Multiplex PCR amplifications often require an extensive optimization to amplify several loci in a single reaction in order to avoid primer–dimer formation, differences in annealing temperatures and overlapping between allele size ranges. In this study, 15 microsatellite loci were combined into three multiplex PCRs and they were successfully optimized. The remaining four loci were not included in the multiplex PCRs because during optimization they showed triallelic patterns or excessive stuttering. These

phenomena complicate the interpretation of electropherograms and, therefore, the genotyping process.

Multiplex amplification success rates were higher in those multiplex with fewer loci (multiplex 2: 97.5 %; multiplex 3: 98 %). However, multiplex 1, that has almost two times the number of microsatellites, also showed a high percentage (81.14 %). Moreover, characteristics of the loci (N_a , H_o , H_e) were not affected by multiplex PCR amplification (Table 3).

In conclusion, this study provides the first microsatellite markers developed and characterized for *D. trunculus*. These 19 microsatellite markers and the multiplex PCRs designed for their amplification will be a useful tool in population genetics analysis of the species. As the aquaculture of the wedge clam is at an early stage, this study will be helpful in the design of effective management strategies for natural and hatchery stocks culture. Moreover, the microsatellite loci characterized represent the first step forward to the construction of genetic linkage maps and to the genetic dissection of production traits.

Acknowledgments We thank Dra. Dorotea Martínez and Susana Nóvoa from Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo—CIMA (Xunta de Galicia) for supplying the wedge clam samples, Jose García Gil for his technical assistance and Luisa Martínez for helpful comments on earlier versions of this manuscript. We would also like to thank Dr. James D. Austin for their revision of English grammar and style. This work was supported by the Consellería de Economía e Industria (Xunta de Galicia) through project 10MMA103013 and by Ministerio de Educación through a predoctoral FPU fellowship awarded to Ana Nantón.

References

1. Tebble N (1966) British bivalve seashells. A handbook for identification. Trustees of the British Museum (Natural History), Edinburgh
2. Bayed A, Guillou J (1985) Contribution to the study of populations of the *Donax* genus: the population of *Donax trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia). *Ann Inst Oceanogr* 61(2):139–147
3. Gaspar MB, Ferreira R, Monteiro CC (1999) Growth and reproductive cycle of *Donax trunculus* L., (Mollusca : Bivalvia) off Faro, southern Portugal. *Fish Res* 41(3):309–316
4. Chicharro L, Chicharro A, Gaspar M, Alves F, Regala J (2002) Ecological characterization of dredged and non-dredged bivalve fishing areas off south Portugal. *J Mar Biol Assoc UK* 82(1):41–50
5. Vale P, Sampayo MAD (2002) Evaluation of marine biotoxin's accumulation by *Acanthocardia tuberculatum* from Algarve, Portugal. *Toxicon* 40(5):511–517
6. Zeichen MM, Agnesi S, Mariani A, Maccaroni A, Ardizzone GD (2002) Biology and population dynamics of *Donax trunculus* L. (Bivalvia: Donacidae) in the South Adriatic Coast (Italy). *Est Coast Shelf Sci* 54(6):971–982
7. Thébaud O, Véron G, Fifas S (2005) Incidences des épisodes d'efflorescences de micro algues toxiques sur les écosystèmes et sur les pêcheries de coquillages en baie de Douarnenez. In: *Rapport Ifremer R.INT.DCB/DEM – DCB/STH/UDPP 05-010*. Brest, France, pp 88
8. Ramón M, Cano J, Peña JB, Campos MJ (2005) Current status and perspectives of mollusc (bivalves and gastropods) culture in the Spanish Mediterranean. *Bol Inst Esp Oceanogr* 21:361–373
9. Molares J, Parada JM, Navarro-Pérez E, Fernández A (2008) Variabilidad interanual de las ventas de los principales recursos marisqueros de Galicia y su relación con las condiciones ambientales. *Rev Gal Rec Mar (Art Inf Tecn)* 2(1):1–42
10. Martínez-Patiño D, Nóvoa S, Ojea J, Rodríguez E (2003) Determinación de la talla de primera maduración sexual de la coquina, *Donax trunculus* (Linné, 1758) (Mollusca:Bivalvia), en un banco natural de la Ría del Barquero (NO Galicia). In: *Libro de Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura*. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía, pp 215–217
11. Bert TM, Crawford CR, Tringali MD, Seyoum S, Galvin JL, Higham M, Lund C (2007) Genetic management of hatchery-based stock enhancement. In: Bert TM (ed) *Ecological and genetic implications of aquaculture activities*. Springer, Dordrecht, pp 123–174
12. Holsinger KE, Gottlieb LD (1991) Conservation of rare and endangered plants—principles and prospects. In: Falk DA, Holsinger KE (eds) *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, New York, pp 195–208
13. Martínez L, Arias A, Méndez J, Insua A, Freire R (2009) Development of twelve polymorphic microsatellite markers in the edible cockle *Cerastoderma edule* (Bivalvia: Cardiidae). *Conserv Genet Resour* 1(1):107–109
14. Pereira SM, Arias A, Méndez J, Insua A, Freire R (2010) Isolation of twelve microsatellite markers in the pullet carpet shell *Venerupis pullastra* (Bivalvia: Veneridae). *Conserv Genet Resour* 2:201–203
15. Arias-Pérez A, Fernández-Tajes J, Gaspar MB, Méndez J (2012) Isolation of microsatellite markers and analysis of genetic diversity among east atlantic populations of the sword razor shell *Ensis siliqua*: a tool for population management. *Biochem Genet* 50(5–6):397–415
16. Porta J, Porta JM, Martínez-Rodríguez G, Álvarez MD (2006) Development of a microsatellite multiplex PCR for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and its application to broodstock management. *Aquaculture* 256(1–4):159–166
17. Fernández-Tajes J, Méndez J (2007) Identification of the razor clam species *Ensis arcuatus*, *E. siliqua*, *E. directus*, *E. macha*, and *Solen marginatus* using PCR-RFLP analysis of the 5S rDNA region. *J Agric Food Chem* 55(18):7278–7282
18. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10(4):506–513
19. Billote N, Lagoda PJL, Risterucci AM, Baurens FC (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54:277–288
20. Edwards KJ, Barker JHA, Daly A, Jones C, Karp A (1996) Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *Biotechniques* 20(5):758–760
21. Megléc E (2007) MICROFAMILY (version 1): a computer program for detecting flanking-region similarities among different microsatellite loci. *Mol Ecol Notes* 7(1):18–20
22. Benson G (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 27(2):573–580
23. Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, pp 365–386
24. Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89(3):583–590
25. Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des

- populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier
26. Raymond M, Rousset F (1995) Genepop (version-1.2)—population-genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86(3):248–249
 27. Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43(1):223–225
 28. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4(3):535–538
 29. Brookfield JFY (1996) A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Mol Ecol* 5(3):453–455
 30. Holleley CE, Geerts PG (2009) Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. *Biotechniques* 46(7):511–517
 31. Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol* 11(1):1–16
 32. Reece KS, Ribeiro WL, Gaffney PM, Carnegie RB, Allen SK (2004) Microsatellite marker development and analysis in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*): confirmation of null alleles and non-Mendelian segregation ratios. *J Hered* 95(4):346–352
 33. Evans BS, Knauer J, Taylor JJU, Jerry DR (2006) Development and characterization of six new microsatellite markers for the silver- or gold-lipped pearl oyster, *Pinctada maxima* (Pteriidae). *Mol Ecol Notes* 6(3):835–837
 34. Arias A, Freire R, Méndez J, Insua A (2010) Isolation and characterization of microsatellite markers in the queen scallop *Aequipecten opercularis* and their application to a population genetic study. *Aquat Living Resour* 23(2):199–207
 35. Nève G, Meglécz E (2000) Microsatellite frequencies in different taxa. *Trends Ecol Evol* 15(9):376–377
 36. Meglécz E, Petenian F, Danchin E, Coeur d'Acier A, Rasplus JY, Faure E (2004) High similarity between flanking regions of different microsatellites detected within each of two species of Lepidoptera: *Parnassius apollo* and *Euphydryas aurinia*. *Mol Ecol* 13(6):1693–1700
 37. Cruz F, Pérez M, Presa P (2005) Distribution and abundance of microsatellites in the genome of bivalves. *Gene* 346:241–247
 38. Meglécz E, Anderson SJ, Bourguet D, Butcher R, Caldas A, Cassel-Lundhagen A, Coeur d'Acier A, Dawson DA, Faure N, Fauvelot C, Franck P, Harper G, Keyghobadi N, Kluetsch C, Muthulakshmi M, Nagaraju J, Patt A, Petenian F, Silvain JF, Wilcock HR (2007) Microsatellite flanking region similarities among different loci within insect species. *Insect Mol Biol* 16(2):175–185
 39. McInerney CE, Allcock AL, Johnson MP, Bailie DA, Prodoehl PA (2011) Comparative genomic analysis reveals species-dependent complexities that explain difficulties with microsatellite marker development in molluscs. *Heredity* 106(1):78–87
 40. Jia M, Li J, Wang S (2010) Isolation and characterization of 18 polymorphic microsatellite loci from freshwater pearl mussel (*Cristaria plicata*). *Conserv Genet* 11(3):1131–1133
 41. Arias A, Freire R, Pablo De La Roche J, Román G, Méndez J, Insua A (2011) Identification, inheritance, and variation of microsatellite markers in the black scallop *Mimachlamys varia*. *Biochem Genet* 49(3–4):139–152
 42. Xiao J, Cordes JF, Jones KC, Reece KS (2008) Eleven novel microsatellite markers for the Asian oyster *Crassostrea ariakensis*. *Mol Ecol Resour* 8(4):843–845
 43. Launey S, Ledu C, Boudry P, Bonhomme F, Naciri-Graven Y (2002) Geographic structure in the European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) as revealed by microsatellite polymorphism. *J Hered* 93(5):331–338
 44. Zouros E, Foltz DW (1984) Possible Explanations of heterozygote deficiency in bivalve mollusks. *Malacologia* 25(2):583–591
 45. Chapuis M-P, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol Biol Evol* 24(3):621–631
 46. Vadopalas B, Leclair LL, Bentzen P (2004) Microsatellite and allozyme analyses reveal few genetic differences among spatially distinct aggregations of geoduck clams (*Panopea abrupta*, Conrad 1849). *J Shellfish Res* 23(3):693–706
 47. Munguia-Vega A, Soria G, Pfister T, Cudney-Bueno R (2010) Isolation and characterization of microsatellite loci in the rock scallop (*Spondylus calcifer*) (Bivalvia: Spondylidae) from the Northern Gulf California, Mexico. *Conserv Genet Resour* 2(1):51–54
 48. Sell J, Mioduchowska M, Kaczmarczyk A, Szymanczak R (2013) Identification and characterization of the first microsatellite loci for the thick-shelled river mussel *Unio crassus* (Bivalvia: Unionidae). *J Exp Zool A* 319(2):113–116



Identification of four *Donax* species by PCR–RFLP analysis of cytochrome c oxidase subunit I (COI)

A. Nantón · R. Freire · A. Arias-Pérez · M. B. Gaspar · J. Méndez

Received: 15 September 2014 / Revised: 4 December 2014 / Accepted: 11 January 2015 / Published online: 23 January 2015
 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract Four *Donax* species, *D. semistriatus*, *D. trunculus*, *D. variegatus* and *D. vittatus*, are found on European coasts. Nevertheless, despite their economic importance there is not a reliable method to differentiate these species independently of their size or condition. Such a method could help to protect consumer rights and avoid commercial fraud due to the replacement of valuable species by less valuable ones with similar morphological traits. In this work, the sequence of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I region was examined in individuals of these species to identify restriction site variation and develop polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphisms assays. Species-specific restriction endonuclease patterns were found with the enzymes AluI, HaeIII and MspI, allowing an exact identification of *Donax* species. This methodology provides simple, reliable and cost-effective identification of four *Donax* species and may be useful to prevent commercial fraud and to increase food traceability.

Keywords *Donax* species · Species identification · PCR–RFLP · COI

Introduction

Mollusk fisheries in coastal areas play a very important role in the European social–economical context, providing a significant source of employment and income. Furthermore, the consumption of seafood products is growing in some countries where these organisms are recognized as an important and healthy part of the human diet [1]. This increase in consumption is leading to the appearance of commercial fraud by replacement of high-value species with cheaper ones having similar morphological characteristics. Because of this, verifying the authenticity of the species is essential to detect and avoid fraud. On the other hand, the identification and authentication of commercial food species is very important to achieve food traceability, to protect consumer rights and to accomplish other quality objectives, such as designation of origin.

Bivalves of the genus *Donax* are widespread on the exposed sandy beaches of tropical and temperate coasts [2], and they are commercially exploited in many European countries. Four *Donax* species, *D. semistriatus*, *D. trunculus*, *D. variegatus* and *D. vittatus*, are common along the Mediterranean and Atlantic coasts and live sympatrically in parts of the European coast, such as in Portugal [3] and Spain [4]. Although *Donax* species can be distinguished by their morphological traits, the species identification based on these characters is unreliable and it may be difficult for non-specialist to apply. Furthermore, specimens without shells, processed products or larval and juvenile forms are morphologically unidentifiable. However, molecular and biochemical techniques could allow their identification independently of their size or condition.

DNA methods based on polymerase chain reaction (PCR) amplification have been successfully used to authenticate fish and seafood species due to their reliability and

A. Nantón (✉) · R. Freire · A. Arias-Pérez · J. Méndez
 Grupo Xenomar, Departamento de Biología Celular e Molecular,
 Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña,
 Campus de A Coruña, 15071 A Coruña, Spain
 e-mail: ana.nanton@udc.es

M. B. Gaspar
 Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I. P.,
 Av. 5 de Outubro, 8700-305 Olhão, Portugal

reproducibility [5]. One of these techniques is PCR–restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP), which consists in the amplification of a DNA fragment, followed by restriction enzyme treatment and electrophoretic separation. Species-specific band profiles allow detecting variation at the DNA level without the necessity of costly DNA sequencing. PCR–RFLP analysis of mitochondrial DNA (mtDNA) has been used to identify several seafood species, such as lobsters [6], mussels [7] or oysters [8]. The accelerated evolutionary rate of mtDNA, which facilitates to find sequence variation in closely related species [9], and its high copy numbers inside cells [10], which aids amplification with low or degraded material, makes mtDNA a good candidate for searching species-specific molecular markers.

The aim of this study was to differentiate four species of the genus *Donax* using PCR–RFLPs of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) region.

Materials and methods

Specimens of *D. trunculus* were collected from O Barqueiro in northwest Spain (Atlantic Coast). Samples of *D. semistriatus*, *D. variegatus* and *D. vittatus* were captured off Lota beach (Vila Real de Santo Antonio) in south Portuguese coast. These specimens were identified by their morphological characteristics according to Macedo et al. [11] and Tebble [12]. DNA was extracted from ethanol-preserved foot according to the Chelex-100 (Sigma-Aldrich, USA)-based method developed by Walsh et al. [13].

Initially we used primers designed by Folmer et al. [14] (HCO2198 and LCO1490) to amplify the COI fragment. Based on the sequences obtained, we subsequently developed a degenerate primer pair that amplified effectively a COI fragment in four *Donax* species in order to develop species-specific PCR–RFLP.

PCR were performed in a final volume of 25 µL containing 80 ng of genomic DNA, 0.2 mM of each dNTP, 2 mM of MgCl₂, 0.6 U of *Taq* DNA polymerase (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), 0.6 µM of each primer (HCO2198: 5'-TAA ACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3' and LCO1490: 5'-G GTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') and the buffer recommended by polymerase suppliers. The amplification process consisted in an initial denaturation step of 3 min at 94 °C, followed by 34 amplification cycles of 45 s at 94 °C, 45 s at 41 °C, 45 s at 72 °C and a final extension step at 72 °C for 3 min. PCR products were migrated on a 2.0 % agarose gel electrophoresis. The gels were stained by immersion in 0.5 µg/mL ethidium bromide, visualized and recorded on a transilluminator Gel Doc XR Systems (Bio-Rad, Barcelona, Spain). Amplified products were sequenced on an ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at the Molecular Biology Unit of the University of A Coruña (Spain).

Nucleotide sequences from *Donax* species obtained were aligned using ClustalW (BioEdit software) [15] and two primers, COIDonax-F (5'-GAGTATAATRCGKACTGARYTRATAC-3') and COIDonax-R (5'-GTGAATRAATAAHACNGGRTCYCC-3'), were designed using Primer3 [16] and manually edited to introduce degenerate nucleotides. Both the amplification process and the reaction mixture were the same as used for HCO2198 and LCO1490 except for the MgCl₂ concentration that was 1.5 mM.

PCR–RFLP analysis

Restriction enzyme selection was performed after comparison of the restriction map of COI sequences obtained with the BioEdit program software [15]. The PCR amplification product of the COI fragment was digested with *AluI*, *HaeIII* and *MspI* restriction endonucleases. The reaction was carried out in a 20-µL reaction volume containing 5 µL of PCR product, 5 U of restriction enzyme and 2 µL of the recommended buffer for each enzyme. For *MspI*, 0.01 % of bovine serum albumin (BSA) was added to the final volume. The digestion mixture was incubated at 37 °C overnight. The reactions were stopped by adding 4 µL of loading buffer. Restriction fragments were loaded on 2.5 % agarose gels, stained with ethidium bromide (0.5 µg/mL) and visualized with a transilluminator Gel Doc XR Systems (Bio-Rad, Barcelona, Spain).

Results and discussion

In the recent years, there has been a growing interest in developing tools to check the correct identification and traceability of seafood products to protect the consumer, to avoid commercial fraud and to ensure composition and safety of commercial marine products. In this work, we developed molecular markers based on PCR amplification and posterior digestion with endonucleases of a fragment of the COI subunit.

When universal primers for COI were used, a fragment of approximately 710 bp, the expected length according to Folmer et al. [14], was amplified in *D. semistriatus*, *D. trunculus*, *D. variegatus* and *D. vittatus*. No apparent size variation was observed among individuals of different species (Fig. 1). In several cases, additional DNA bands of unexpected sizes were observed, as in other bivalves [8], but their intensity was much lower than that of the main band. The PCR product of four individuals from each species was sequenced.

Due to the appearance of nonspecific PCR bands that may interfere with the expected restriction pattern, we decided to design specific primers. The new primers (COIDonax-F and COIDonax-R) amplified a fragment of approximately 596 bp

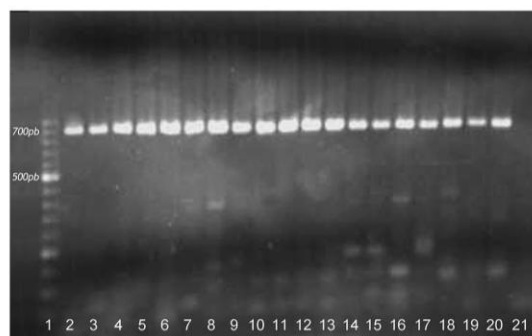


Fig. 1 COI PCR products of *D. vittatus* (lanes 2–9), *D. variegatus* (lanes 10–13), *D. semistriatus* (lanes 14–17) and *D. trunculus* (lanes 18–20) using universal primers (LCO1490 and HCO2198). A 50-bp ladder was used as the DNA marker (lane 1). Negative control (lane 21)

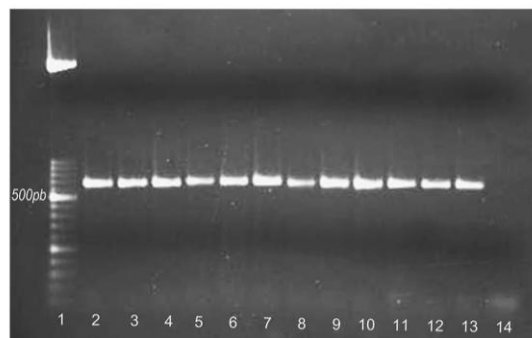


Fig. 2 COI PCR products of *D. semistriatus* (lanes 2–4), *D. trunculus* (lanes 5–7), *D. variegatus* (lanes 8–10) and *D. vittatus* (lanes 11–13) using degenerate primers (COIDonax-F and COIDonax-R). A 50-bp ladder was used as the DNA marker (lane 1). Negative control (lane 14)

in individuals of all four species (Fig. 2), and no nonspecific products were observed. In addition, the smaller size of the new amplicon could facilitate the amplification in degraded DNA, which is often the condition of samples obtained from markets.

The COI sequences were examined for species-specific restriction patterns, and three restriction endonucleases were selected for RFLP analysis: AluI (AG/CT), HaeIII (GG/CC) and MspI (C/CGG). These endonucleases have their recognition sequences in the four *Donax* species, and the inferred restriction fragment patterns are presented in Table 1. The digestion of the amplified products of the four species analyzed revealed the expected profiles (Figs. 3, 4, 5). These three endonucleases gave a characteristic pattern for each of the *Donax* species studied and

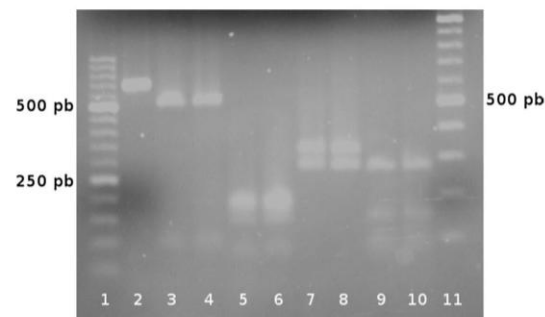
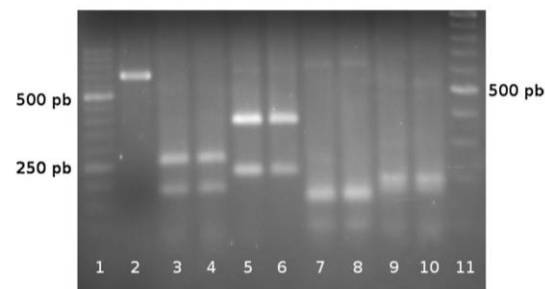
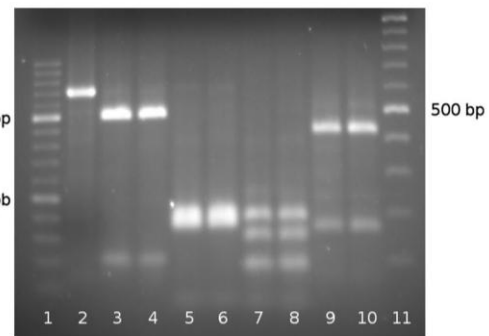
in all cases allowed the unequivocal identification of the wedge clam species. Fragments smaller than 50 bp were not used for identification purposes since they did not provide additional discrimination power and might be difficult to visualize. Intraspecific polymorphism in the PCR–RFLP pattern of the COI region was absent among analyzed individuals for the four species studied, and restriction patterns obtained with each of the three endonucleases were reproducible.

Most of the strategies used for species identification are based on the polymerase chain reaction [5] due to its simplicity, sensitivity and reliability. Several protocols that involve PCR amplification of different regions have been developed to identify bivalve species with commercial value, such as clams [17], cockles [18, 19], mussels [7, 20], razor clams [21, 22] or scallops [23]. In the same line of research, a technique to differentiate *Donax* species based on PCR amplification of 5S rDNA was carried out by Pereira et al. [24]. However, this method only allows differentiating *D. trunculus* and *D. variegatus* from the remaining *Donax* species, whereas the markers described in the present study are capable to discriminate among the four *Donax* species.

PCR–RFLPs analysis is a widely used tool in distinguishing species of different taxonomic groups because it is a cheap and quick method to detect interspecific variation at the DNA sequence level. The potential disadvantage of this technique is the possible existence of intraspecific variability; that is, variation at a particular restriction target site within a species [10]. These mutations can result in the gain or loss of restriction fragments and provide misleading results [9]. However, the use of the COI gene minimizes this possibility due to the low levels of intraspecific polymorphism in marine bivalves [25]. Nevertheless, *Donax trunculus* shows doubly uniparental inheritance (DUI) [26] an unusual mode of mtDNA inheritance, which has been observed in some bivalves, in which two mtDNA types exist and show different transmission routes. One type is transmitted through eggs (F-type) to both female and male offspring and another through sperm (M-type) only to male offspring. In heteroplasmic males, the F-type is the main mtDNA in somatic tissues, while M-type occurs at a much higher level in gonads [27, 28]. The presence of this biparental transmission can affect species identification. To overcome this problem, DNA was extracted from muscle tissue in males and females, where F-type is predominant. This same strategy has been used in several studies of mussel species that also show DUI [7, 29]. Furthermore, PCR–RFLPs assays based on several restriction enzymes can be integrated to make the correct taxonomic assessment and to confirm the species identity. In this study, four *Donax* species were differentiated from each other based on the species-specific restriction patterns using any one of the

Table 1 Expected fragment sizes from restriction digests of COI PCR product with AluI, HaeIII and MspI

Species	Endonuclease	Fragment size (bp)
<i>D. trunculus</i>	AluI	91, 505
<i>D. semistriatus</i>		24, 75, 142, 169, 186
<i>D. variegatus</i>		21, 274, 301
<i>D. vittatus</i>		18, 75, 91, 142, 270
<i>D. trunculus</i>	HaeIII	217, 379
<i>D. semistriatus</i>		15, 55, 83, 182, 261
<i>D. variegatus</i>		15, 28, 55, 88, 94, 156, 160
<i>D. vittatus</i>		13, 55, 80, 83, 169, 196
<i>D. trunculus</i>	MspI	15, 31, 170, 166, 183, 201
<i>D. semistriatus</i>		100, 496
<i>D. variegatus</i>		31, 31, 87, 99, 152, 196
<i>D. vittatus</i>		166, 430

**Fig. 3** Restriction analysis of the COI PCR products of *D. trunculus* (lanes 3, 4), *D. semistriatus* (lanes 5, 6), *D. variegatus* (lanes 7, 8) and *D. vittatus* (lanes 9, 10) with AluI. Lanes 1, 2 and 11 are a 50-bp DNA marker, a undigested COI product and a 100-bp DNA marker, respectively**Fig. 4** Restriction analysis of the COI PCR products of *D. semistriatus* (lanes 3, 4), *D. trunculus* (lanes 5, 6), *D. variegatus* (lanes 7, 8) and *D. vittatus* (lanes 9, 10) with HaeIII. Lanes 1, 2 and 11 are a 50-bp DNA marker, a undigested COI product and a 100-bp DNA marker, respectively**Fig. 5** Restriction analysis of the COI PCR products of *D. semistriatus* (lanes 3, 4), *D. trunculus* (lanes 5, 6), *D. variegatus* (lanes 7, 8) and *D. vittatus* (lanes 9, 10) with MspI. Lanes 1, 2 and 11 are a 50-bp DNA marker, a undigested COI and a 100-bp DNA marker, respectively

three enzymes (AluI, HaeIII or MspI). However, patterns obtained with AluI and MspI are more easily interpreted.

The results obtained in current study corroborate the usefulness of the COI region for species identification. Markers based on this mitochondrial region are one of the most employed markers in this field since Hebert et al. [30] proposed it for DNA bar coding. Furthermore, its easy amplification using universal primers [14] is one important advantage of gene COI. In bivalves, the use of this region has been reported for the discrimination of different species with commercial value, such as mussels [7, 31], oysters [8, 32–34] or scallops [35].

The PCR–RFLPs identified in the present work provide a simple, robust, reliable and inexpensive approach in only two steps, PCR amplification of COI region followed by RFLP analysis with AluI HaeIII or MspI endonucleases and allow differentiating four *Donax* species. This procedure can be used to prevent commercial fraud and to increase food traceability.

Acknowledgments We thank Jose García for his technical assistance in the laboratory and Luisa Martínez for her constructive and valuable comments. This work was supported by the Consellería de Economía e Industria (Xunta de Galicia) through project IOMMA103013 and by Ministerio de Educación of Spain through a predoctoral FPU fellowship awarded to Ana Nantón.

Conflict of interest None.

Compliance with Ethics Requirements This article does not contain any studies with human or animal subjects.

References

- Helm MM, Bourne N, Lovatelli A (comp/ed) (2004) Hatchery culture of bivalves. A practical manual. Fisheries Technical Paper No. 471. FAO, Rome, p 177

2. Ansell AD (1983) The biology of the genus *Donax*. Sandy beaches as ecosystems. In: McLachlan A, Erasmus T (eds) *Sandy beaches as ecosystems*. Junk, The Hague
3. Rufino MM, Gaspar MB, Pereira AM, Maynou F, Monteiro CC (2010) Ecology of megabenthic bivalve communities from sandy beaches on the south coast of Portugal. *Sci Mar* 74:163–178
4. Salas C, Tirado C, Manjón-Cabeza ME (2001) Sublethal foot-predation on Donacidae (Mollusca: Bivalvia). *J Sea Res* 46:43–56
5. Bossier P (1999) Authentication of seafood products by DNA patterns. *J Food Sci* 64:189–193
6. García-Rodríguez FJ, Ponce-Díaz G, Muñoz-García I, González-Armas R, Pérez-Enríquez R (2008) Mitochondrial DNA markers to identify commercial spiny lobster species (*Panulirus* spp.) from the Pacific coast of Mexico: an application on phyllosoma larvae. *Fish Bull* 106:204–212
7. Fernández-Tajes J, Longa A, García-Gil J, Chiu Y-W, Huang Y-S, Méndez J, Lee R-S (2011) Alternative PCR-RFLP methods for mussel *Mytilus* species identification. *Eur Food Res Technol* 233:791–796
8. Klinbunga S, Khamnamtong N, Tassanakajon A, Puanglarp N, Jarayabhand P, Yoosukh W (2003) Molecular genetic identification tools for three commercially cultured oysters (*Crassostrea belcheri*, *Crassostrea irradalei*, and *Saccostrea cucullata*) in Thailand. *Mar Biotechnol* 5:27–36
9. Pereira F, Cameiro J, Amorim A (2008) Identification of species with DNA-based technology: current progress and challenges. *Recent Pat DNA Gene Seq* 2:187–199
10. Mackie IM, Pryde SE, Gonzales-Sotelo C, Medina I, Perez-Martin R, Quinteiro J, Rey-Mendez M, Rehbein H (1999) Challenges in the identification of species of canned fish. *Trends Food Sci Technol* 10:9–14
11. Macedo MC, Macedo MI, Borges JP (1999) *Conchas marinhas de Portugal*. Editorial Verbo, Lisboa
12. Tebble N (1966) British bivalve seashells. A handbook for identification. British Museum, Edinburgh
13. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10:506–513
14. Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3:294–299
15. Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98
16. Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, pp 365–386
17. Fernández A, García T, Asensio L, Rodríguez MA, González I, Hernández PE, Martín R (2001) PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region for identification of 3 clam species. *J Food Sci* 66:657–661
18. Freire R, Insua A, Méndez J (2005) *Cerastoderma glaucum* 5S ribosomal DNA: characterization of the repeat unit, divergence with respect to *Cerastoderma edule*, and PCR-RFLPs for the identification of both cockles. *Genome* 48:427–442
19. Freire R, Arias A, Méndez J, Insua A (2011) Identification of European commercial cockles (*Cerastoderma edule* and *C. glaucum*) by species-specific PCR amplification of the ribosomal DNA ITS region. *Eur Food Res Technol* 232:83–86
20. Santaclara FJ, Espineira M, Cabado G, Aldasoro A, González-Lavin N, Vieites JM (2006) Development of a method for the genetic identification of mussel species belonging to *Mytilus*, *Perna*, *Aulacomya*, and other genera. *J Agric Food Chem* 54:8461–8470
21. Fernández-Tajes J, Méndez J (2007) Identification of the razor clam species *Ensis arcuatus*, *E. siliqua*, *E. directus*, *E. macha*, and *Solen marginatus* using PCR-RFLP analysis of the 5S rDNA region. *J Agric Food Chem* 55:7278–7282
22. Freire R, Fernández-Tajes J, Méndez J (2008) Identification of razor clams *Ensis arcuatus* and *Ensis siliqua* by PCR-RFLP analysis of ITS1 region. *Fish Sci* 74:511–515
23. López-Piñón MJ, Insua A, Méndez J (2002) Identification of four scallop species using PCR and restriction analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region. *Mar Biotechnol* 4:495–502
24. Pereira AM, Fernández-Tajes J, Gaspar MB, Méndez J (2012) Identification of the wedge clam *Donax trunculus* by a simple PCR technique. *Food Control* 23:268–270
25. Hare MP, Palumbi SR, Butman CA (2000) Single-step species identification of bivalve larvae using multiplex polymerase chain reaction. *Mar Biol* 137(5–6):953–961
26. Theologidis I, Fodelianakis S, Gaspar MB, Zouros E (2008) Doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial DNA in *Donax trunculus* (Bivalvia : Donacidae) and the problem of its sporadic detection in Bivalvia. *Evolution* 62:959–970
27. Stewart DT, Saavedra C, Stanwood RR, Ball AO, Zouros E (1995) Male and female mitochondrial-DNA lineages in the blue mussel (*Mytilus edulis*) species group. *Mol Biol Evol* 12:735–747
28. Sutherland B, Stewart D, Kenchington ER, Zouros E (1998) The fate of paternal mitochondrial DNA in developing female mussels, *Mytilus edulis*: implications for the mechanism of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genetics* 148:341–347
29. Westfall KM, Wimberger PH, Gardner JPA (2010) An RFLP assay to determine if *Mytilus galloprovincialis* Lmk. (Mytilidae; Bivalvia) is of Northern or Southern hemisphere origin. *Mol Ecol Resour* 10:573–575
30. Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR (2003) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc B Biol Sci* 270:S96–S99
31. Theriault TW, Docker MF, Orlova MI, Heath DD, MacIsaac HJ (2004) Molecular resolution of the family Dreissenidae (Mollusca: Bivalvia) with emphasis on Ponto Caspian species, including first report of *Mytilopsis leucophaea* in the Black Sea basin. *Mol Phylogenet Evol* 30:479–489
32. Boudry P, Heurtebise S, Collet B, Cornette F, Gerard A (1998) Differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis. *J Experimental Mar Biol Ecol* 226:279–291
33. Yu ZN, Kong XY, Zhang LS, Guo XM, Xiang JH (2003) Taxonomic status of four *Crassostrea* oysters from China as inferred from mitochondrial DNA sequences. *J Shellfish Res* 22:31–38
34. Liu J, Li Q, Kong L, Yu H, Zheng X (2011) Identifying the true oysters (Bivalvia: Ostreidae) with mitochondrial phylogeny and distance-based DNA barcoding. *Mol Ecol Resour* 11:820–830
35. Feng Y, Li Q, Kong L, Zheng X (2011) DNA barcoding and phylogenetic analysis of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia) based on mitochondrial COI and 16S rRNA genes. *Mol Biol Rep* 38:291–299